

Tesis Doctoral

**Biosíntesis del harzianum A y su
papel en la fisiología y en la actividad
de biocontrol ejercida por
Trichoderma arundinaceum.**

Mónica Gómez Malmierca

León, 2013



**Universidad
de León**

Departamento de Biología Molecular
Área de Microbiología



universidad
de león

Biosíntesis del harzianum A y su papel en la fisiología y en la actividad de biocontrol ejercida por *Trichoderma arundinaceum*.

“Biosynthesis of hazianum A and its role in the physiology
and in the biocontrol activity of *Trichoderma arundinaceum*”

Mónica Gómez Malmierca

Universidad de León
Dpto. Biología Molecular. Área Microbiología.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología

Dña. Mónica Gómez Malmierca

León, Marzo 2013.

Agradecimientos

Al Dr. Santiago Gutiérrez Martín, por brindarme la oportunidad de iniciarme en el mundo científico a tu lado, tu total dedicación y entrega para que este trabajo pudiera llevarse a cabo y por esas discusiones científicas con un Nesteria en la mano.

A la Dra. Rosa Elena Cardoza Silva, por compartir conmigo todos tus conocimientos y “truquillos” en el laboratorio, tu disponibilidad y apoyo a lo largo de estos años.

Al Dr. Enrique Monte Vázquez y a la Dra. Rosa Hermosa Prieto, por ayudarme con los temas de fisiología vegetal y por vuestra participación y consejos durante todo el trabajo.

To Dr. Nancy Alexander and Dr. Susan McCormick, for giving me the chance to stay in your lab for 3 amazing months, for all your priceless help and hard work and for making me feel like I was at home, sharing your family and friends with me.

Al Dr. Javier Casqueiro Blanco, por servir de enlace entre León y Ponferrada y pensar en mí para la realización de este trabajo.

Al Dr. Elías Rodríguez Olivera, por convertirte en un compañero con el que hablar sobre cualquier tema y permitirme usurparte el sitio miles de veces.

Al Dr. Ángel Rumbero Sánchez, por tus desinteresadas charlas telefónicas sobre química analítica en un momento crítico de esta Tesis.

Al Dr. Isidro González Collado, por toda tu colaboración e ideas sobre antagonismo y análisis de metabolitos secundarios, que terminaron formando parte destacada de este trabajo.

To Dr. Robert Proctor, for all your help with the “deep world” of gene evolution and inheritance, and for sharing your lunch time with me.

Al Dr. Carlos Barreiro Méndez, por tu simpatía y dedicación a la hora de enseñarme a extraer y analizar las proteínas de esta cepa.

A mis padres y a mi hermano, por enseñarme lo que vale el esfuerzo y mostrarme vuestro ánimo y apoyo en todo momento. Todo esto no habría sido posible sin vosotros.

A Cris, por estar ahí incondicionalmente todos estos años y soportar a la doctoranda histérica y estresada de estos últimos meses.

A mis amigos de León, Marcos, Valle, Ana, Raquel... por hacerme desconectar los fines de semana y regalarme vuestro cariño y simpatía... aunque todavía no entendáis porque "tengo que trabajar en domingo".

A mis niñ@s del café, Ana, Rodri y Alba, Johanna, Isa y Andrés, Fran... porque no tenéis ni idea de lo mucho que habéis contribuido a que esta leonesa haya terminado su Tesis feliz de vivir en Ponferrada.

A Pepe, por tu ayuda y alegría diaria, haciendo que los días de trabajo duro no lo fueran tanto.

A mis compañeras de piso, Moni y Yoana, por tantos y tantos buenos momentos en el piso 14 del Marpa.

To the Lab's girls of Peoria, Marcie, Jennifer, Stephanie and Kim, for being so kind and patient with me.

A las instituciones que, con su aporte económico, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral: Junta de Castilla y León y Ministerio de Ciencia e Innovación de España.

A todos, muchas gracias.

A mis padres

Abreviaturas empleadas en esta memoria

3-ADON: 3-acetildesoxinivalenol.

4-ANIV: 4-acetilnivalenol.

4,15-diANIV: 4,15-diacetilnivalenol.

15-ADON: 15-acetildesoxinivalenol.

aa: aminoácido.

ACB: agente de control biológico.

ADNc: ADN complementario.

AS: acetosiringona.

ATCC: American Type Culture Collection, VA, EE.UU.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tools*.

BSA: albúmina sérica bovina.

BOT: botridial.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España.

CIAP: fosfatasa alcalina de intestino de ternera (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*).

CoA: coenzima A.

Ct: ciclo umbral (*threshold cycle*).

DEPC: dietilpirocarbonato.

DIG: digoxigenina.

DMAPP: dimetilalil pirofosfato.

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato.

DON: desoxinivalenol.

DPP: diacilglicerol pirofosfato.

DTT: ditioneitol.

E: eficiencia.

EDTA: tetra-acetato di-etileno disódico.

EPT: 12,13-epoxitrichotec-9-ene.

ET: etileno.

FPP: farnesil pirofosfato.

FRC: *Fusarium* Research Center, PE, EE.UU.

GC: cromatografía de gases.

GGPP: geranilgeranil pirofosfato.

GPP: geranil pirofosfato.

h: hora.

HA: harzianum A.

HMG-CoA: hidroximetilglutaril coenzima A.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia (*High Performance Liquid Chromatography*).

HR: respuesta hipersensitiva.

HT-2: hidroxil T-2.

IBT: Institutet for Bioteknologi, Denmark.

IMI: International Mycological Institute, Egham, UK.

IPP: isopentenil pirofosfato.

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

ISR: resistencia sistémica inducida.

ITS: *Internal Transcribed Spacer*.

JA: ácido jasmónico.

MAMP: patrón molecular asociado a microorganismos beneficiosos.

MAPK: *Mitogen- Activated Protein Kinases*.

min: minuto.

MS: espectrometría de masas.

MVA: mevalonato.

NIV: nivalenol.

NMR: resonancia magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*).

NRRL: Northern Regional Research Laboratory, IL, EE.UU.

ORF: marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*).

p-NF- β DG: p-nitrofenil- β -D-glucosaminida.

p-NF: p-nitrofenol.

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos.

pb: par de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PEG: polietilenglicol.

PKS: poliquétido sintasa.

PNK: polinucleótido kinasa.

PR: proteína relacionada con patogenicidad (*Pathogen Related*).

PS: peso seco.

qPCR: PCR a tiempo real.

RI: inhibición radial del crecimiento.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

s: segundo.

SA: ácido salicílico.

SAR: resistencia sistémica adquirida.

SDS: dodecilsulfato sódico.

T34: *Trichoderma harzianum* CECT 2413.

Ta37: *Trichoderma arundinaceum* IBT 40837.

TD: trichodieno.

TF: factor de transcripción.

TFA: ácido trifluoroacético.

TLC: cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*).

Tm: temperatura de melting.

Ufp: unidad formadora de placa de lisis.

USDA: *United States Department of Agriculture*.

UV: ultravioleta.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

AMINOÁCIDOS

A	Alanina	M	Metionina
C	Cisteína	N	Asparagina
D	Ácido aspártico	P	Prolina
E	Ácido glutámico	Q	Glutamina
F	Fenilalanina	R	Arginina
G	Glicina	S	Serina
H	Histidina	T	Treonina
I	Isoleucina	V	Valina
K	Lisina	W	Triptófano
L	Leucina	Y	Tirosina

BASES NITROGENADAS

A	Adenina	S	G/C
C	Citosina	K	G/T
G	Guanina	M	A/C
T	Timina	B	C/G/T
U	Uracilo	D	A/G/T
R	G/A	H	A/C/T
Y	C/T	V	A/C/G
W	A/T	N	A/C/G/T

Índice

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Trichotecenos	1
1.1. Los comienzos	1
1.2. Importancia de los trichotecenos	2
1.3. Química de los trichotecenos	4
1.4. Ecología de los trichotecenos	6
2. El género <i>Trichoderma</i>	7
2.1. Morfología y ecología	10
2.2. Aplicaciones biotecnológicas	11
2.3. <i>Trichoderma arundinaceum</i>	11
2.4. Biocontrol ejercido por <i>Trichoderma</i>	13
3. Interacciones <i>Trichoderma</i>-planta	15
3.1. Resistencia a estreses abióticos	17
3.2. Otros efectos beneficiosos del tratamiento con <i>Trichoderma</i>	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	21
MATERIALES	21
1. Organismos utilizados	21
1.1. Hongos filamentosos	21
1.2. Cepas bacterianas	22
1.3. Levaduras	22
1.4. Material vegetal	23
2. Vectores utilizados	23
2.1. Vectores fágicos	23
2.2. Vectores plasmídicos	24
2.3. Construcciones plasmídicas	26
3. Medios de cultivo	30
3.1. Medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos	30
3.1.1. Medios de cultivo para <i>A. tumefaciens</i>	31
3.2. Medios de cultivo para hongos filamentosos	32
3.3. Medios de cultivo para levaduras	34
3.4. Medios de cultivo para plantas	36
4. Reactivos empleados	37
4.1. Reactivos químicos de uso general	37
4.2. Reactivos específicos para biología molecular	37
4.2.1. Enzimas de restricción yificadoras de ácidos nucleicos	37
4.2.2. Enzimas de digestión de membranas y paredes celulares	37

4.2.3. Sistemas comerciales (kits)	38
4.2.4. Antibióticos y otros compuestos	38
4.2.5. Oligonucleótidos	39
4.2.6. Marcadores de peso molecular	40
5. Instrumental	40

MÉTODOS

6. Cultivo y mantenimiento de los organismos	42
6.1. Hongos filamentosos	42
6.1.1. <i>T. arundinaceum</i>	42
6.1.1.1. Obtención de esporas	42
6.1.1.2. Obtención de micelio para extracción de ADN	42
6.1.1.3. Obtención de micelio para extracción de ARN y de sobrenadante para análisis de compuestos	42
6.1.2. Otros hongos	42
6.1.3. Mantenimiento	43
6.2. Cepas bacterianas	43
6.2.1. Cultivo	43
6.2.2. Mantenimiento	43
6.3. Plantas de tomate	43
7. Análisis y manipulación de ácidos nucleicos	43
7.1. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos	43
7.2. Análisis y manipulación de ADN	44
7.2.1. Limpieza y precipitación de ADN	44
7.2.2. Extracción de ADN total de hongos filamentosos	45
7.2.3. Extracción de ADN de levaduras	45
7.2.4. Aislamiento de ADN plasmídico	45
7.2.4.1. Lisis alcalina	46
7.2.4.2. Minipreparaciones (<i>minipreps</i>)	46
7.2.4.3. GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare)	47
7.2.5. Tratamiento con desoxirribonucleasa A (ADNasa A)	47
7.2.6. Electroforesis en geles de agarosa	47
7.2.6.1. Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	48
7.2.7. Digestión del ADN con enzimas de restricción	48
7.2.8. Reacciones modificadoras del ADN	49
7.2.8.1. Desfosforilación de extremos 5' de moléculas de ADN	49
7.2.8.2. Fosforilación de extremos 3' de moléculas de ADN	50
7.2.8.3. Rellenado de extremos cohesivos 5' de moléculas de ADN	50
7.2.8.4. Adición de adeninas en el extremo 3' de fragmentos de ADN	50
7.2.8.5. Ligación de moléculas de ADN	51

7.2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
7.2.9.1. Terra™ PCR Direct Polymerase MIX (Clontech, CA, EE.UU.)	54
7.2.10. Hibridación de ADN en membrana	54
7.2.10.1. Transferencia por capilaridad	55
7.2.10.2. Marcaje de la sonda	56
7.2.10.3. Hibridación del ADN	56
7.2.10.4. Inmunodetección de la sonda marcada con DIG	57
7.2.11. Secuenciación del ADN	58
7.2.12. Software empleado en el análisis del ADN	58
7.3. Análisis y manipulación de ARN	60
7.3.1. Obtención del ARN total de hongos filamentosos	60
7.3.2. Tratamiento con desoxirribonucleasa I (ADNasa I)	60
7.3.3. Retrotranscripción del ARN (RT-PCR)	61
7.3.3.1. Superscript III one-step RT-PCR with <i>Platinum Taq</i> Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.)	61
7.3.3.2. Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EE.UU.)	62
7.3.4. PCR a tiempo real (qPCR)	63
7.3.4.1. Software empleado en el análisis de datos de qPCR	66
8. Utilización de genotecas de ADN en vectores fágicos	66
8.1. Construcción de la genoteca de ADN genómico de Ta37	66
8.1.1. Digestión del ADN genómico de la cepa Ta37	66
8.1.2. Fraccionamiento del ADN genómico en gradientes de sacarosa y ligación de las fracciones seleccionadas con el vector fágico λ DASHII	67
8.1.3. Encapsidación “ <i>in vitro</i> ” del ADN del fago λ DASHII y derivados	67
8.1.4. Preparación de las células hospedadoras	68
8.1.5. Infección en medio sólido y titulación de la genoteca	69
8.2. Hibridación de la genoteca con sondas de ADN	69
8.2.1. Infección en medio sólido para hibridar	69
8.2.2. Transferencia, hibridación y revelado	70
8.2.3. Aislamiento de placas de lisis positivas y segunda ronda de infección	70
8.3. Aislamiento del ADN de los clones positivos	71
8.3.1. Amplificación de los bacteriófagos de interés	71
8.3.2. Obtención del ADN de los bacteriófagos de interés	71
9. Transformación genética de microorganismos	72
9.1. Transformación genética de bacterias	72
9.1.1. Transformación genética de <i>E. coli</i>	72
9.1.1.1. Obtención de células competentes	72
9.1.1.2. Transformación genética de <i>E. coli</i>	73
9.1.2. Transformación genética de <i>A. tumefaciens</i>	73
9.1.2.1. Preparación de las células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	73

9.1.2.2. Transformación por electroporación de <i>A. tumefaciens</i>	74
9.2. Transformación genética de hongos filamentosos	74
9.2.1. Transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> AGL1	74
9.2.1.1. Preparación de <i>A. tumefaciens</i> AGL1	74
9.2.1.2. Transformación de Ta37	75
9.2.2. Transformación de Ta37 mediada por protoplastos	75
9.2.2.1. Obtención de los protoplastos	75
9.2.2.2. Transformación vía protoplastos	76
9.3. Transformación genética de levaduras	76
10. Purificación y análisis del harzianum A	77
10.1. Métodos de extracción del HA	77
10.1.1. Extracción del HA de forma rutinaria	77
10.1.2. Extracción del HA destinado a purificación	78
10.1.3. Extracción del HA a partir de medio sólido	78
10.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	78
10.2.1. HPLC semipreparativa	79
10.2.2. HPLC analítica	79
10.3. Purificación del HA	79
11. Identificación de compuestos mediante resonancia magnética nuclear (NMR)	80
12. Antibiograma frente al HA	81
13. Experimentos de “feeding”	81
14. Análisis de intermediarios de la ruta de síntesis del HA	82
14.1. Métodos de extracción	82
14.1.1. Extracción de cultivos de levaduras	82
14.1.2. Extracción de cultivos de hongos filamentosos	83
14.2. Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS)	83
14.2.1. Detección de isotrichodiol	83
14.2.2. Detección de trichodieno, trichodermol e intermediarios no identificados	84
15. Ensayos de antagonismo entre hongos filamentosos	84
15.1. Enfrentamientos duales	84
15.2. Ensayos de crecimiento en membrana	85
15.3. Bioensayo de la actividad del HA frente a <i>B. cinerea</i>	86
15.4. Ensayos de inhibición de la germinación de esporas	87
16. Cuantificación del ergosterol y del escualeno intracelulares	87
17. Determinación de actividades enzimáticas	89
17.1. Cuantificación del contenido proteico	89
17.2. Determinación colorimétrica de la actividad quitinasa	90
17.2.1. Obtención de las muestras	90
17.2.2. Ensayo colorimétrico	90

17.3. Determinación espectrofotométrica de la actividad HMG-CoA reductasa	91
17.3.1. Obtención de las muestras	91
17.3.2. Ensayo enzimático	91
18. Ensayos con plantas de tomate	92
18.1. Esterilización de las semillas	92
18.2. Cultivos hidropónicos	92
18.3. Cultivo de plantas de tomate sobre sustrato	93
18.3.1. Pildorado de las semillas	93
18.3.2. Medición de los parámetros de la planta	93
18.3.3. Inoculación del patógeno <i>B. cinerea</i>	93
III. CAPÍTULO 1: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CLUSTER DE BIOSÍNTESIS	
DEL HARZIANUM A. PURIFICACIÓN DEL HARZIANUM A.	
INTRODUCCIÓN	95
1. Trichotecenos y su biosíntesis	95
1.1. Agrupación de los genes de biosíntesis de trichotecenos	96
1.2. Ruta de biosíntesis de terpenos	98
1.2.1. Síntesis del precursor IPP	98
1.2.2. Unión de unidades de IPP	99
1.3. Ruta de biosíntesis de trichotecenos	100
1.3.1. El gen <i>TRI5</i> (trichodieno sintasa)	101
1.3.2. El gen <i>TRI4</i> (P450 monooxigenasa)	102
1.3.3. Los genes <i>TRI101</i> , <i>TRI11</i> y <i>TRI3</i>	104
1.3.4. Resto de genes <i>TRI</i> estructurales	105
1.3.5. Genes reguladores de la ruta	107
1.3.6. Gen <i>TRI12</i> (transportador de trichotecenos)	108
1.3.7. Genes de función desconocida	109
2. Harzianum A	109
OBJETIVOS	111
RESULTADOS	113
1. Clonación del cluster de biosíntesis del harzianum A	113
1.1. Obtención de las sondas de los genes <i>tri4</i> y <i>tri6</i>	113
1.2. Obtención de la sonda del gen <i>tri5</i>	115
1.3. Puesta a punto de las condiciones de hibridación	115
1.4. Hibridación de las sondas de los genes <i>tri</i> con la genoteca de Ta37	117
2. Caracterización de los genes y proteínas Tri de Ta37	120
2.1. Caracterización de los genes <i>tri</i> de Ta37	120
2.2. Caracterización <i>in silico</i> de las proteínas Tri de Ta37	121

2.3. Caracterización funcional de los genes <i>tri4</i> , <i>tri5</i> y <i>tri11</i> de Ta37	124
2.3.1. Caracterización funcional del gen <i>tri5</i>	125
2.3.2. Caracterización funcional del gen <i>tri4</i>	126
2.3.3. Caracterización funcional del gen <i>tri11</i>	127
3. Estudio de la expresión de los genes implicados en la síntesis del HA en Ta37	128
4. Purificación y análisis del harzianum A	129
4.1. Selección del pico cromatográfico candidato a ser el HA	129
4.2. Purificación del HA mediante HPLC semipreparativa	130
4.3. Análisis del HA mediante HPLC analítica	133
4.4. Dinámica de producción del HA en cultivos de Ta37	134
DISCUSIÓN	137
IV. CAPÍTULO II: EFECTO ANTAGONISTA DE LA CEPA Ta37 SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS: PAPEL DEL HARZIANUM A. INTERACCIONES ENTRE Ta37 Y EL PATÓGENO <i>B. cinerea</i>.	
INTRODUCCIÓN	143
1. Mecanismos de antagonismo ejercidos por <i>Trichoderma</i>	143
1.1. Antagonismo por competición	143
1.2. Antibiosis	145
1.3. Micoparasitismo	146
2. El patógeno <i>Botrytis cinerea</i>	150
2.1. El proceso infeccioso	151
2.1.1. Penetración en la planta	151
2.1.2. Invasión y colonización	152
2.2. Factores de patogenicidad de <i>B. cinerea</i>	152
OBJETIVOS	155
RESULTADOS	157
1. Silenciamiento e interrupción del gen <i>tri4</i> de Ta37	157
1.1. Silenciamiento del gen <i>tri4</i> en Ta37	157
1.1.1. Obtención de los transformantes de Ta37 silenciados en el gen <i>tri4</i>	157
1.1.2. Comprobación de los transformantes de Ta37 silenciados en el gen <i>tri4</i>	158
1.2. Interrupción del gen <i>tri4</i> en Ta37	159
1.2.1. Obtención de los transformantes de Ta37 interrumpidos en el gen <i>tri4</i>	159
1.2.2. Comprobación de los transformantes de Ta37 interrumpidos en el gen <i>tri4</i>	160
2. Interrupción del gen <i>tri5</i> de Ta37	161
2.1. Obtención de transformantes de Ta37 interrumpidos en el gen <i>tri5</i>	161
2.2. Comprobación de los transformantes	162

2.3. Complementación del mutante Ta Δ Tri5	164
3. Caracterización de los transformantes obtenidos	166
3.1. Producción de metabolitos derivados de la ruta de biosíntesis del HA	166
3.2. Estudio morfológico	168
3.3. Estudio de la expresión de los genes <i>tri</i>	169
3.4. Producción de ergosterol y de escualeno	171
3.5. Estudio de la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de terpenos	173
3.6. Estudio de la actividad HMG-CoA reductasa	174
4. Valoración de la capacidad antagonista de Ta37: papel del HA como antifúngico ...	175
4.1. Ensayos duales de enfrentamiento	175
4.2. Ensayos de antagonismo en membrana	177
4.3. Ensayos de inhibición de la germinación de esporas de <i>B. cinerea</i>	180
4.4. Ensayos de inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> por parte del HA	181
4.5. Estudio de la actividad quitinasa	181
4.6. Estudio de la expresión de los genes <i>tri</i> en la zona de interacción <i>Trichoderma</i> vs. patógeno	182
4.7. Estudio de la expresión de genes de virulencia de <i>B. cinerea</i> B05-10	184
4.8. Producción de HA en la zona de interacción	186
DISCUSIÓN	189
V. CAPÍTULO III: EFECTO DE LAS CEPAS DE <i>Trichoderma</i> SOBRE LA INFECCIÓN CAUSADA POR <i>B. cinerea</i> EN PLANTAS DE TOMATE. INDUCCIÓN DE LOS GENES DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE POR PARTE DE LAS CEPAS DE <i>Trichoderma</i>.	
INTRODUCCIÓN	201
1. Efectos directos de <i>Trichoderma</i> sobre la planta	201
1.1. Biofertilización	201
1.2. Estimulación de las defensas sistémicas de las plantas	202
2. Respuestas defensivas en plantas	203
2.1. Inducción de las respuestas de defensa	204
2.1.1. Resistencia sistémica adquirida (SAR)	204
2.1.2. Resistencia sistémica inducida (ISR)	205
2.1.3. Inducción de las defensas de las plantas por parte de microorganismos beneficiosos	206
OBJETIVOS	209
RESULTADOS	211
1. Cultivos hidropónicos de plantas de tomate en presencia de la cepa Ta37	211

2. Efecto de las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> en el desarrollo de las plantas de tomate	212
3. Efecto de <i>Trichoderma</i> sobre las lesiones foliares causadas por <i>B. cinerea</i> en plantas de tomate	213
4. Inducción de las respuestas defensivas en plantas de tomate	215
DISCUSIÓN	223
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	231
VII. <u>ANEXOS</u>	233
1. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	233
2. Secuencias nucleotídicas y proteicas obtenidas en este trabajo	237
3. Espectros de NMR	247
VIII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	251

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Trichotecenos.

1.1. Los comienzos...

La actividad antifúngica de *Trichothecium roseum* frente a otros hongos fue descrita en 1909 por el patólogo de plantas Herbert H. Whetzel, pero no fue hasta 1948 cuando se aisló el compuesto responsable de dicha actividad. Freeman y Morrison identificaron el compuesto responsable de la inhibición de la germinación de esporas de *Botrytis allii* por parte de *T. roseum*: la trichotecina, el primer trichoteceno descrito.

Inicialmente, los trichotecenos fueron el objeto de estudio de veterinarios ya que se vio que producían intoxicaciones en animales de granja. El descubrimiento de las aflatoxinas carcinogénicas, a mediados de los 60, aumentó el interés por las micotoxinas y el desarrollo de nuevos métodos analíticos a partir de productos vegetales (Desjardins *et al.*, 1993), hasta que, a finales de los años 70 y en la década de los 80, estos compuestos adquirieron una relevancia global debido al incidente conocido hoy como “*Yellow Rain*”.

El *Yellow Rain* fue un conflicto político que surgió tras la guerra de Vietnam y que aún hoy está muy lejos de resolverse. En 1981 el Secretario de Estado de los Estados Unidos, Alexander Haig, acusó públicamente a la Unión Soviética de suministrar armas químicas (trichotecenos en concreto) a sus aliados comunistas de Laos y Camboya, quienes las utilizaron como represalia contra las tribus Hmong, que lucharon a favor de EE.UU. durante la guerra. Estas acusaciones estaban basadas en testimonios de refugiados Hmong en Tailandia que describían cómo, tras el paso de aviones que lanzaban nubes de gas coloreado, polvo o líquido aceitoso, la gente enfermaba e incluso moría. Entre los síntomas descritos se encontraban desde calor y escozor en la piel, vómitos normalmente acompañados de sangre, visión borrosa, dolor de cabeza y diarrea hasta importantes hemorragias, problemas neurológicos, bajada de tensión o incluso la muerte (se calcula que entre el 10 y el 20% de las personas expuestas murieron en un plazo de horas o días). Estos “ataques” dejaban manchas amarillas del tamaño de gotas de lluvia en el suelo, la vegetación (Fig. 1) y los tejados, de ahí el nombre de *Yellow Rain*.



Figura 1. Manchas amarillas sobre la vegetación en el sudeste asiático durante los supuestos ataques químicos con trichotecenos.

Científicos del gobierno de EE.UU. aseguran que en las muestras recogidas tanto de plantas como de personas enfermas se encontraron altos niveles de mezclas de trichotecenos, mezclas que no se darían de forma natural en la zona, apoyando así la idea de guerra química. Además, los síntomas descritos por los refugiados coincidían con los observados en animales intoxicados con este tipo de micotoxinas.

Sin embargo, otras comisiones científicas apoyan la hipótesis de que las manchas amarillas eran en realidad heces de abejas. Basan esta suposición en que en las manchas se encontraron altos niveles de polen y que la composición de ese polen y de los trichotecenos encontrados, incluso en manchas adyacentes, era diferente. Además, hongos productores de trichotecenos son comunes en las áreas afectadas. Tomando todos estos datos, se sugirió que las intoxicaciones pudieron deberse a la ingestión de vegetales infectados por hongos productores de micotoxinas y que todo ello coincidió con defecaciones en masa de abejas, un fenómeno ya descrito en la zona del sureste asiático (Tucker, 2001).

Tras acusaciones cruzadas de mala práctica científica, este incidente sigue sin ser clarificado. Pero a raíz de él, son numerosos los grupos científicos interesados en el estudio de este tipo de compuestos.

1.2. Importancia de los trichotecenos.

Los trichotecenos son metabolitos secundarios de naturaleza sesquiterpenoide, dentro del grupo de las micotoxinas, producidos principalmente por hongos filamentosos, del orden Hypocreales, de los géneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Spicillum*, *Trichothecium*, *Stachybotrys* y *Cephalosporium* (Ueno, 1985). Estos hongos han sido

encontrados por todo el mundo y están bien adaptados para colonizar y crecer sobre sustratos con un amplio margen de humedad y condiciones nutricionales. También se han descrito dos especies de plantas dentro del género *Baccharis* productoras de trichotecenos macrocíclicos (Sharma y Kim, 1991; Jarvis, 1992).

El interés en estas toxinas reside en que aparecen muy frecuentemente como contaminantes de alimentos, principalmente cereales, pudiendo contaminar tanto las plantas en el campo de cultivo como los granos almacenados en silos. La severidad de dicha contaminación aumenta en condiciones de alta humedad durante la cosecha y el almacenaje de los granos.

Los hongos del género *Fusarium* son los principales responsables de la contaminación de cereales con trichotecenos. Estos hongos son importantes patógenos de maíz, trigo y otros cereales ampliamente distribuidos por todo el mundo, siendo responsables de pérdidas millonarias debido a la disminución tanto de la producción como de la calidad del grano (Fig. 2.A) (Windels, 2000). Además de su fitotoxicidad, los trichotecenos juegan un papel muy importante como factores de virulencia en la enfermedad “podredumbre de la mazorca o espiga” (*ear rot*) de maíz y trigo causada por *F. graminearum* (Proctor *et al.*, 1995; Desjardins *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1999). Los principales trichotecenos producidos por el género *Fusarium* son la toxina T-2 (*F. sporotrichioides*), el desoxinivalenol (DON; *F. graminearum*) y el nivalenol (NIV; *F. culmorum*).

Debido a esta alta incidencia en los cultivos de cereales, son comunes las intoxicaciones tanto de animales como de seres humanos. Los síntomas incluyen retardo del crecimiento, desórdenes reproductivos e inmunológicos, falta de apetito, anemia, hemorragias, vómitos e incluso la muerte (Rocha *et al.*, 2005). Todos los animales testados son sensibles a trichotecenos, y la gravedad de sus síntomas varía en función de la especie animal afectada, de la vía de exposición y del tipo y concentración de la micotoxina (Desjardins *et al.*, 1993).

Su principal modo de acción es la inhibición de la síntesis proteica en eucariotas (McLaughlin *et al.*, 1977): todos los trichotecenos tienen la capacidad de inhibir la actividad de la peptidil transferasa compitiendo para fijarse al sitio de unión al ribosoma (Cole y Cox 1981), pero son los diferentes grupos funcionales los que les confieren su distinta actividad (Ueno, 1985). Además, se han observado otros efectos celulares de los trichotecenos en plantas y animales: inhibición de la síntesis de ADN y ARN, alteración de las membranas celulares, activación de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), inducción de las

citoquinas iniciando la respuesta inflamatoria, activación de la apoptosis o alteración de la función mitocondrial (revisado por Rocha *et al.*, 2005).

Por todo ello, cada vez son más los países que fijan reglamentos para las micotoxinas con el fin de salvaguardar la salud de sus ciudadanos y sus intereses económicos. A finales de 2003 eran casi 100 los países con límites legales de concentración de micotoxinas en los alimentos y ese número sigue aumentando (Fig. 2.B.) (FAO, 2003).

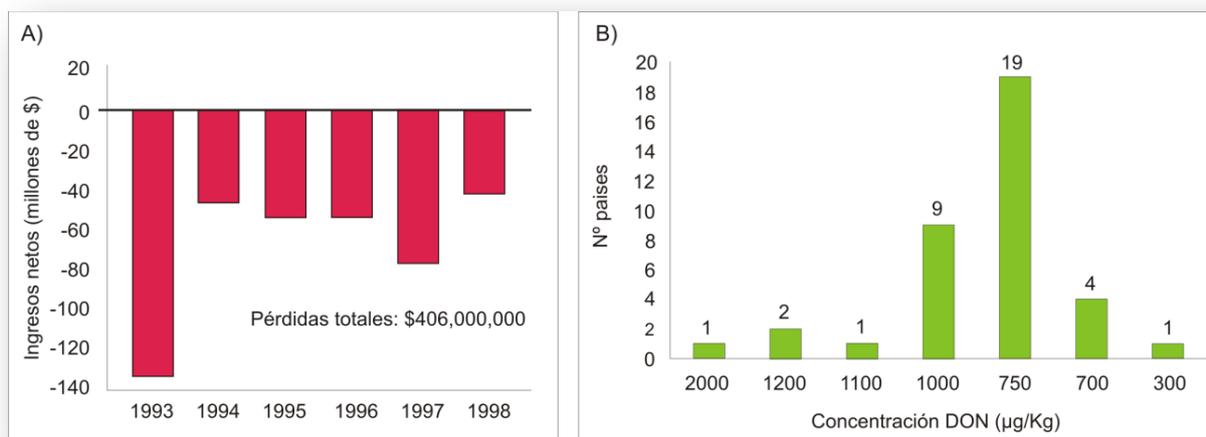


Figura 2. A) Pérdidas económicas (en dólares) causadas por *Fusarium* en cultivos de cebada en Dakota del Norte, Dakota del Sur y Minnesota entre los años 1993 y 1998 (Modificada de Windels, 2000). B) Número de países a nivel mundial que han establecido límites legales para la concentración de DON en harina de trigo y otros cereales, frente a la concentración máxima permitida de la toxina (modificada de FAO, 2003).

1.3. Química de los trichotecenos.

Los trichotecenos forman un grupo muy numeroso de compuestos estructuralmente muy diferentes, conociéndose en la actualidad más de 200 (Grove, 2007), pero todos ellos comparten un núcleo tricíclico (conocido como trichoteceno) con un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y un grupo epóxido (esencial para su toxicidad) entre los carbonos 12 y 13.

Se trata de compuestos de naturaleza sesquiterpenoide, no volátiles y de bajo peso molecular. Su solubilidad varía en función del número de grupos polares que contenga su estructura, sin embargo todos son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. Son estables a la luz, al aire y al calor (incluso a 120°C) y se inactivan con hipoclorito sódico al 3 – 5% (Domínguez, 2005).

Su diversidad estructural radica en los diferentes grupos funcionales que se suman al núcleo trichoteceno. Atendiendo a su estructura química, se dividen en 4 grupos (Fig. 3.) (Ueno, 1985):

- **Tipo A:** contienen un enlace simple en C-8. Son los más numerosos e incluyen la importante toxina T-2 producida por *F. sporotrichioides* y los trichotecenos producidos por *Trichoderma* (trichodermina y harzianum A).
- **Tipo B:** presentan un grupo carbonilo en C-8. Comprende trichotecenos tan importantes en agricultura como el DON y el NIV producidos por *F. graminearum* y *F. culmorum*, respectivamente.
- **Tipo C:** contienen un grupo epóxido adicional entre C-7 y C-8. Son minoritarios y producidos por especies no pertenecientes al género *Fusarium*. Pertenece a este grupo la crotocina producida por el hongo *Acremonium crotocinigenum*.
- **Tipo D:** presentan un grupo carbonilo en C-8 y un anillo macrocíclico de diversa complejidad entre los carbonos C-4 y C-15. Incluyen la roridina E y la verrucarina A, ambos producidos por los géneros *Myrothecium* y *Stachybotrys*.

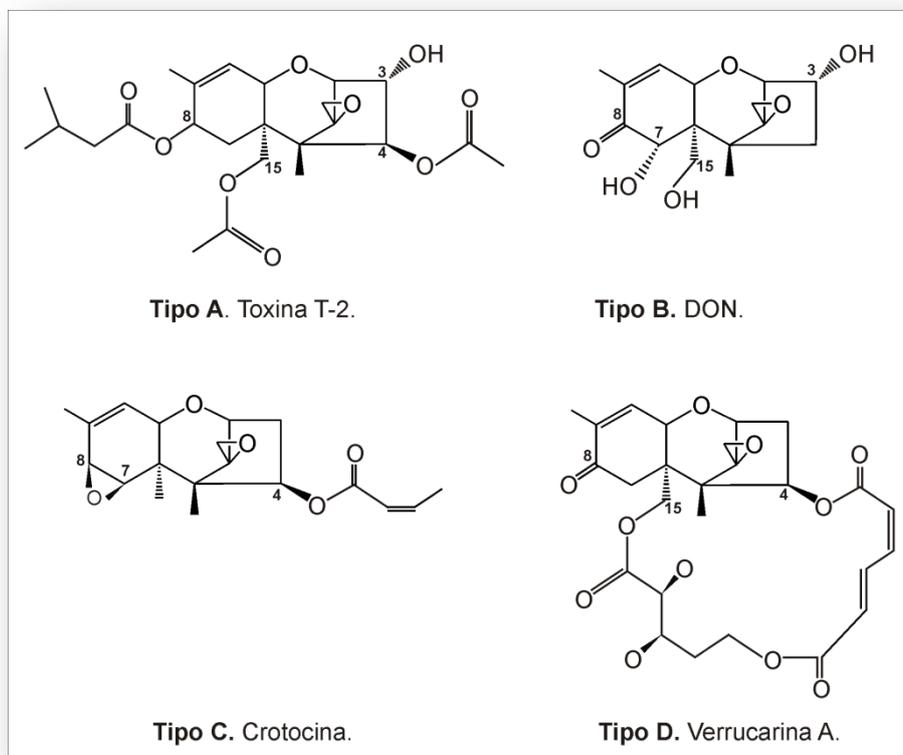


Figura 3. Tipos de trichotecenos según su estructura química.

1.4. Ecología de los trichotecenos.

Está demostrado que los metabolitos secundarios no son necesarios para el crecimiento, el desarrollo o la reproducción del organismo productor (Bennett, 1983), sin embargo su síntesis conlleva un gran gasto energético. Entonces, ¿por qué producen los hongos metabolitos secundarios como los trichotecenos?

Esta pregunta sigue sin respuesta, aunque son varias las hipótesis que se han planteado. La más aceptada es que sirven de ventaja ecológica para el organismo productor dentro de su nicho trófico (Fox and Howlett, 2008), ya que pueden ayudar a solubilizar nutrientes del medio o actuar como sustancias antibióticas frente a otros competidores, entre otras funciones.

Otra de las hipótesis que está ganando más adeptos en los últimos años es que la producción de micotoxinas podría ayudar a detoxificar el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células (revisado por Reverberi *et al.*, 2010). Estas ROS son producidas durante procesos metabólicos como la respiración, pero son dañinas para las células ya que generan un estado de estrés oxidativo, es decir, un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en la célula. Está demostrado que este tipo de estrés induce la síntesis de trichotecenos tipo B por parte de *Fusarium*: al añadir peróxido de hidrógeno (agente oxidante) al medio, se induce la expresión de varios genes implicados en la biosíntesis de estos compuestos incrementándose la síntesis de DON (Ponts *et al.*, 2007); mientras que el antioxidante ácido ferúlico tiene el efecto contrario (Boutigny *et al.*, 2009).

Concretamente para los trichotecenos, se ha demostrado su papel como factores de virulencia en *Fusarium* ya que son fitotoxinas que producen clorosis, necrosis y otros síntomas en varios tipos de plantas (Proctor *et al.*, 1997). Por ejemplo, mutantes de *F. culmorum* en los que la expresión del gen *tri5* se ve reprimida, presentan una menor producción de DON y una menor virulencia frente a plantas de trigo (Scherm *et al.*, 2011). Contrariamente, poco se sabe sobre la función que ejercen los trichotecenos producidos por hongos del género *Trichoderma*, aunque recientemente nuestro grupo demostró cómo la superproducción del trichoteceno trichodermina por parte del mutante Tb41tri5 (obtenido mediante la sobreexpresión del gen *tri5* en *T. brevicompactum* IBT40841) tenía un efecto nocivo sobre la germinación y el desarrollo de plantas de tomate (Tijerino *et al.*, 2011b).

2. El género *Trichoderma*.

El género *Trichoderma* está compuesto por hongos filamentosos pertenecientes a la División *Deuteromycota* (en la que se incluyen los hongos anamórficos o imperfectos por conocerse sólo su propagación asexual, a través de conidios, y no la sexual) y, dentro de ésta, a la Clase de los *Hifomicetos* (producen conidios o esporas asexuales a partir de células desnudas, sin la envoltura adicional de un cuerpo fructífero) (Gams *et al.*, 1987). En algunos aislamientos se ha descrito el estado perfecto o sexual (teleomorfo) dentro del género *Hypocrea* (Druzhinina y Kubicek, 2005; Samuels, 2006) y se ha demostrado que las especies del género *Trichoderma* son derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual (Kuhls *et al.*, 1996). Por ejemplo, se ha identificado a *Hypocrea lixii* como el estado teleomorfo de *T. harzianum* (Chaverri *et al.*, 2003).

Debido a sus amplias aplicaciones biotecnológicas, es uno de los géneros fúngicos más estudiados, habiéndose completado, hasta el momento, el genoma de 3 de sus especies: *T. reesei* (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>), *T. atroviride* (<http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>) y *T. virens* (<http://genome.jgi-psf.org/TriviGv2982/TriviGv2982.home.html>). Dependiendo de la especie, el número de cromosomas varía entre 3 y 7 y el tamaño del genoma entre 31 y 39 Mb (Hayes *et al.*, 1993).

Persoon describió este género por primera vez en 1794. La taxonomía del género ha estado basada tradicionalmente en criterios morfológicos, lo cual ha provocado una gran confusión e imprecisión en el momento de clasificar nuevos aislados, debido probablemente al amplio rango de variación (en términos morfológicos) que presenta *Trichoderma* o porque los términos para definir estas características no son lo suficientemente precisos como para poder diferenciar claramente unas especies de otras. El primero en utilizar estos criterios morfológicos para hacer un estudio taxonómico del género fue Rifai en 1969, que definió nueve agregados específicos. Desde entonces se han ido utilizando otros caracteres para intentar esclarecer la taxonomía de *Trichoderma*: perfiles de isoenzimas (Zamir y Chet, 1985), características fisiológicas o bioquímicas (Grondona *et al.*, 1997), siendo lo más aceptado y utilizado en los últimos años estudios de la Biología Molecular de los hongos, incluyendo RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DNA *fingerprinting* o la secuenciación de partes concretas del genoma o SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) (Muthumeenakshi *et al.*, 1994).

Particularmente útiles resultan los datos de secuencias obtenidos de las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) y de genes que codifican para el factor de elongación de la

transcripción 1- α (*tef-1*), la endoquitinasa 42 (*ech42*) o los ADNr 18 y 28S, ya que han permitido establecer taxones moleculares (Kullnig *et al.*, 2000; Kubicek *et al.*, 2003), describir nuevas especies como *T. asperellum* (Lieckfeldt *et al.*, 1999) o *T. pleurotum* (Komon-Zelazowska *et al.*, 2007), relacionar especies como *T. harzianum* con su fase sexual *Hypocrea lixii* (Chaverri *et al.*, 2003), o distinguir y tipificar aquellas cepas que son dañinas para los cultivos de champiñón (Hermosa *et al.*, 2000). En base a todos estos análisis, el género *Trichoderma* está dividido en la actualidad en cuatro secciones: *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Longibrachiatum* e *Hypocrearium*; y 13 clades (Fig. 4) (Samuels, 2006; Lieckfeldt *et al.*, 1998; Degenkolb *et al.*, 2008). En el año 2010, la subcomisión internacional de *Trichoderma/Hypocrea* definió 104 especies que han sido caracterizadas inequívocamente a nivel molecular (Schuster y Schmoll, 2010). Para facilitar la identificación de las diferentes especies de *Trichoderma* se han creado recientemente herramientas online, como *TrichoKey* o *TrichoBLAST* basadas en el análisis de las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 y del 4º intrón del gen *tef1*, cuya base de datos se actualiza constantemente, y que permiten identificar virtualmente nuevos aislados de *Trichoderma*, e incluso clasificarlos dentro de posibles nuevas especies (ISTH, 2008).

Las especies dentro de este género son una importante fuente de compuestos, ya que, aparte de producir diferentes tipos de enzimas extracelulares (tales como proteasas, celulasas, quitinasas o glucanasas), también producen un gran número de metabolitos bioactivos de naturaleza y actividad muy distinta: peptaiboles (péptidos lineales que alteran la membrana plasmática de hongos), lactonas, isonitrilos, compuestos de bajo peso molecular, poliquétidos (como las pironas volátiles o las konigininas, con actividad antifúngica o reguladora del crecimiento de las plantas), micotoxinas (incluyendo compuestos citotóxicos e inmunosupresores como la gliotoxina o los terpenos del tipo de los trichotecenos) (Nielsen *et al.*, 2005; Degenkolb *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006), entre otros. Dentro de los metabolitos producidos por *Trichoderma*, cabría destacar los de naturaleza terpenoide ya que constituyen el grupo más abundante y ampliamente distribuido de metabolitos en la naturaleza. Los compuestos de este tipo producidos por *Trichoderma* presentan una gran diversidad de actividades, entre las que cabría destacar la micotóxica, exhibida por los trichotecenos o la viridina, la fitotóxica ejercida por el viridiol y la estructural llevada a cabo por el ergosterol (Cardoza *et al.*, 2005). Todo esto hace que sean especies muy interesantes a la hora de desarrollar aplicaciones biotecnológicas con fines muy diferentes.

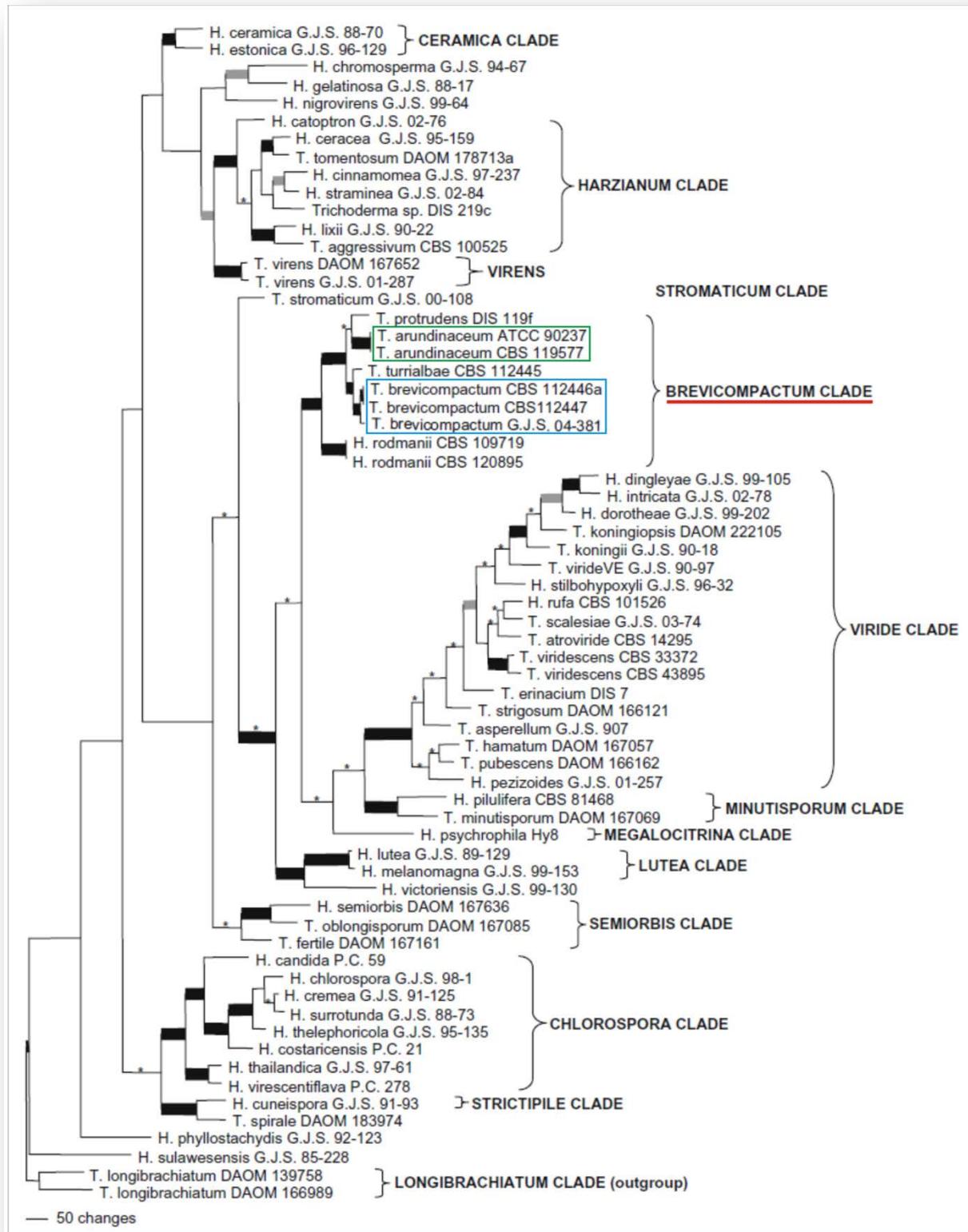


Figura 4. Grupos moleculares establecidos para el género *Trichoderma*. Árbol filogenético basado en el estudio de las secuencias de los genes de la subunidad II de la ARN polimerasa (*rpb2*), el factor de elongación de la transcripción 1- α (*tef1*) y de las regiones ITS1 e ITS2. Se destacan las especies productoras de trichotecenos dentro del *clade* Brevicompactum. Modificado de Degenkolb *et al.*, 2008.

2.1. Morfología y ecología.

Las especies de este género son cosmopolitas, versátiles, muy frecuentes en suelos forestales, agrícolas o dedicados a pastos, y capaces de adaptarse a distintas condiciones climáticas. De hecho, aunque la mayoría de las especies estudiadas provienen de Norte América y Europa, también se han encontrado en el resto del continente americano y en el sudeste asiático. Se trata de hongos que típicamente habitan en el suelo o en madera en descomposición (Kraus *et al.*, 2004) (Fig. 5). Los sustratos utilizados por *Trichoderma* son muy variados, de ahí la gran abundancia de cepas de este género en suelos de todo tipo (se ha calculado que hasta un 3% de los propágulos fúngicos totales en suelos forestales pertenecen a este género y hasta un 1,5% en pastizales). Esta capacidad de colonización proviene sin duda de la gran variedad de enzimas hidrolíticas que produce. *Trichoderma* prefiere suelos ácidos ricos en materia orgánica, siendo el hierro un elemento esencial para su correcto desarrollo (Hubbard *et al.*, 1983; Klein y Eveleigh, 1998).

La mayoría de las especies del género *Trichoderma* producen grandes cantidades de conidios generalmente de color verde (a veces hialinos), uninucleados y ovoides, formados a partir de células conidiógenas con ontogenia fialídica (Kirk *et al.*, 2001). Los conidióforos son muy ramificados (semejantes a arbustos con forma piramidal), están tabicados y contienen más de un núcleo. Los conidios son ovoides, con pared típicamente lisa (a veces rugosa) y con un solo núcleo (Fig 5). En condiciones de estrés, ya sea nutricional o hídrico, producen unas estructuras asexuales llamadas clamidosporas (Lewis y Papavizas, 1984).

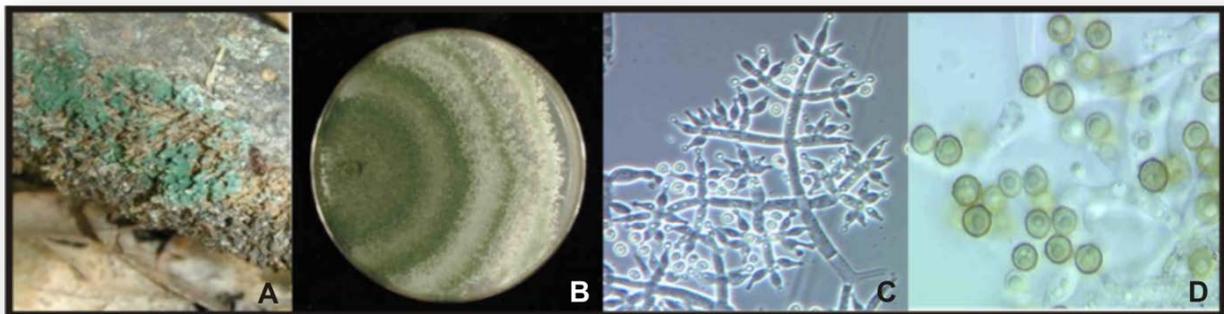


Figura 5. Morfología característica de *Trichoderma harzianum*. A) Hongo creciendo sobre madera en descomposición. B) Colonia creciendo en medio PDA. C) Conidióforos. D) Conidios uninucleados. Imágenes tomadas de Samuels *et al.*, 2012.

2.2. Aplicaciones biotecnológicas.

Trichoderma posee características que lo convierten en un organismo con un gran interés industrial. Por ejemplo, *T. reesei* posee una gran capacidad para degradar material celulósico, por lo que sus aplicaciones comerciales no han hecho más que crecer: participación en fermentaciones alcohólicas, elaboración de detergentes para el lavado de ropa, blanqueo del papel reciclado, alimentación animal o producción de biocombustibles (Reese y Mandels, 1989; Kubicek *et al.*, 1990).

Entre las aplicaciones de *Trichoderma* se encuentran también la producción de enzimas de interés industrial, la biorremediación y la producción de plantas transgénicas con genes de *Trichoderma* que codifiquen para enzimas hidrolíticas (por ejemplo, quitinasas) que aumenten su resistencia frente a fitopatógenos (Lorito *et al.*, 1998). El empleo de celulasas producidas por este género ha alcanzado un gran desarrollo tanto en la industria alimentaria como en la textil. Otra característica de estos hongos que los hace especialmente interesantes en la industria es su capacidad para secretar proteínas, lo cual puede ser explotado para su utilización con fines farmacéuticos. Por otra parte, se han descrito especies de *Trichoderma* con efecto estimulador del crecimiento de plantas (Chet e Inbar, 1994) traducido en un incremento en la altura, diámetro y/o peso seco, entre otros parámetros.

Pero sin duda, la aplicación biotecnológica de *Trichoderma* más extendida y más desarrollada es su uso como agente de control biológico (ACB). Esta propiedad fue descubierta en 1934 por Weindling al describir cómo *T. lignorum* (*T. viride*) se enroscaba entorno a las hifas de otros hongos produciendo su muerte. Este autor sugirió que se utilizaran inóculos de *T. viride* para controlar a ciertos patógenos y desde entonces han surgido varias preparaciones comerciales con ese fin, compuestas principalmente por *T. harzianum*, *T. viride* y *T. virens* (Monte, 2001).

2.3. *Trichoderma arundinaceum*.

T. arundinaceum (anteriormente *T. brevicompactum*) es una especie descrita muy recientemente por Günther F. Kraus (2004), por lo que poco se conoce todavía sobre ella. La primera mención de la cepa objeto de estudio del presente trabajo (*T. brevicompactum* IBT 40837) data de 2005 por parte de Nielsen y colaboradores. Fue el equipo de Degenkolb

en 2008 el que la renombró como *T. arundinaceum* IBT 40837, basándose en sus características genéticas, bioquímicas y morfológicas.

Se descubrió en suelos de América y del sudeste asiático, aunque ahora se sabe que se encuentra en suelos de prácticamente todo el mundo, principalmente en Irán, Namibia y EE.UU. Ocupa un nicho ecológico para el que sus habilidades nutricionales son esenciales: es capaz de utilizar la mayoría de los carbohidratos (ya sean mono-, oligo- o polisacáridos) de forma mucho más eficiente que otras especies del género *Trichoderma*, así como aminoácidos y ácidos orgánicos.

Sus características morfológicas no difieren mucho de las ya comentadas para el género *Trichoderma*: las colonias crecen en densos agregados verdosos, con conidióforos ramificados en forma piramidal y con esporas subglobosas o ligeramente elipsoidales (2-3 μm de diámetro) de color verde claro. No produce pigmentos difusibles al medio y no genera ningún olor característico (Fig. 6). Lo que diferencia a esta especie de otras del mismo género es su crecimiento mucho más lento y su temperatura óptima de crecimiento más alta (30-32°C). Todo esto, junto con sus propiedades fisiológicas, parece indicar que está especialmente adaptada para la degradación de polisacáridos vegetales.

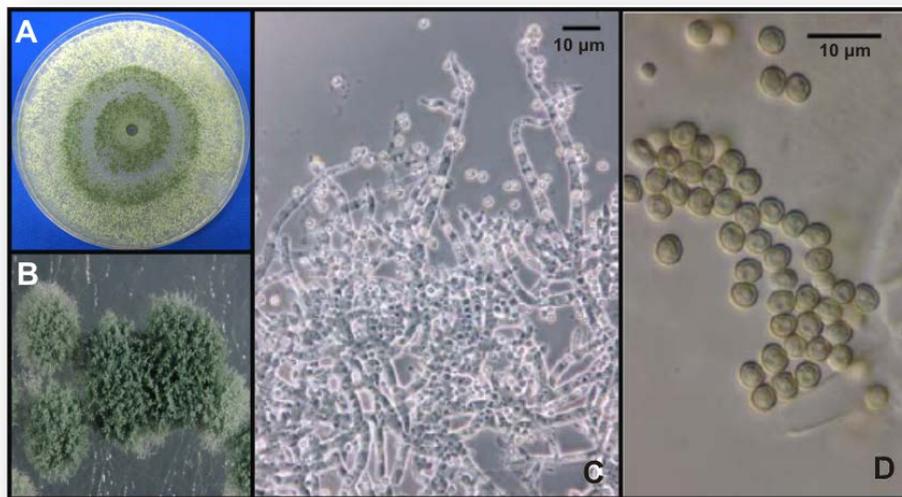


Figura 6. *Trichoderma arundinaceum*. A y C: colonia creciendo sobre el medio PPG y conidióforos de *T. arundinaceum* IBT 40837, respectivamente. B: Pústulas de *T. arundinaceum* ATCC 90237. D: Conidios de *T. arundinaceum* CBS 119575. Imagen B tomada de Samuels *et al.*, 2012. Imágenes C y D tomadas de Degenkolb *et al.*, 2008.

En cuanto a la producción de metabolitos secundarios, se trata de una especie interesante ya que es de las pocas dentro del género *Trichoderma* que sintetiza

trichotecenos, diferenciándose dos quimiotipos diferentes: los productores de harzianum A (como las cepas *T. arundinaceum* IBT 40837 y ATCC 90237) y los productores de trichodermina (como la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841) (Nielsen *et al.*, 2005). Basándose en la capacidad de producir trichotecenos, así como de otros metabolitos secundarios, y utilizando datos anteriores sobre morfología, taxonomía molecular y estudios filogenéticos, Degenkolb y colaboradores describieron en 2008 una nueva línea dentro del género *Trichoderma*: el *clade* Brevicompactum, que incluye a las especies *T. brevicompactum*, *T. arundinaceum*, *T. turrialbense* y *T. protrudens*.

2.4. Biocontrol ejercido por *Trichoderma*.

Las enfermedades vegetales, en particular las causadas por agentes patógenos (bacterias, virus, viroides y especialmente hongos fitopatógenos) provocan cada año cuantiosas pérdidas en la producción agrícola y en la calidad de los alimentos con los consecuentes problemas económicos, no sólo debidos a la menor producción, sino también al intento de eliminar dichas enfermedades y a la necesidad del saneamiento de la población vegetal, lo que se refleja en última instancia en un aumento de los precios de los alimentos básicos. Además, no sólo las cosechas se ven afectadas, también el material almacenado (grano, fruta, etc.) puede ser infectado (Monte, 2001).

Históricamente se han utilizado sustancias químicas para el control de enfermedades vegetales (control químico), pero el abuso y su mala aplicación han tenido numerosos efectos adversos, de los cuales cabría destacar la aparición de patógenos resistentes a dichas sustancias y las consecuencias nocivas sobre el medio ambiente y organismos no objeto de ese control (Vinale *et al.*, 2008b). Todo esto ha creado la necesidad de buscar alternativas surgiendo el concepto de control biológico, cuya primera definición apareció en 1919 como “la regulación de la población de una plaga por sus enemigos naturales”. Posteriormente, Baker y Cook (1974) propusieron una definición mucho más precisa: “El control biológico consiste en la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas”. Sin embargo, debido al desarrollo de nuevas técnicas de Biología Molecular, esta definición se ha quedado obsoleta, por lo que la Academia Nacional de las Ciencias de los EE.UU. (NAS, 1987) propuso una nueva: “la utilización de organismos naturales o

modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables, y para favorecer organismos útiles para el hombre, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos beneficiosos”.

Sin embargo no hay que olvidar las limitaciones de los agentes de control biológico (ACBs) ya que tienen un rango de acción más limitado sobre los patógenos que los pesticidas químicos. Lo que tiende a aplicarse es un control integrado que combina el uso de ACBs con pequeñas cantidades de sustancias químicas obteniéndose niveles de supresión de la enfermedad semejantes a los observados con tratamientos químicos pero con la enorme ventaja de producir menores efectos adversos (Monte, 2001).

Para el control de enfermedades vegetales se han aplicado especies antagonistas de hongos fitopatógenos, de las cuales el 90% corresponde a distintas cepas de *Trichoderma* (Benítez *et al.*, 2004). Una pequeña lista de hongos diana de *Trichoderma* incluye: *Botrytis*, *Dematophora*, *Fusarium*, *Nectria*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus* y *Sclerotinia* (Fig. 7). Se sabe que *Trichoderma* es capaz de controlar ascomicetos, basidiomicetos, oomicetos (Benítez *et al.*, 2004) e incluso nematodos (Goswami *et al.*, 2008).



Figura 7. *Trichoderma* como agente de biocontrol. Se muestra el efecto del tratamiento con esporas de *T. hamatum* de semillas de lechuga frente a los patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (macetas de la parte superior) o *Rhizoctonia solani* (macetas inferiores). Las plantas control aparecen a la izquierda y las tratadas a la derecha. Foto tomada de BBSRC, *growing plants with friendly fungi*.

Es interesante destacar la resistencia de algunas especies de *Trichoderma* a varios fungicidas y fumigantes químicos usados habitualmente en agricultura (Ej. Captan) y también a otros tratamientos dirigidos a disminuir la carga microbiana del suelo. Esto, junto a la velocidad de crecimiento y la fácil adaptación a diversas condiciones climáticas conferiría a *Trichoderma* una ventaja sobre otros hongos en la colonización de suelos.

Un aspecto negativo es que se conocen algunas especies de *Trichoderma* que, bajo determinadas condiciones ambientales, son capaces de atacar cultivos de patata, maíz o

manzanos, entre otros (Hjeljord y Tronsmo, 1998), sin embargo, este género tiende a ser considerado en su conjunto como no fitopatógeno.

Por tanto, el éxito de *Trichoderma* como ACB se debe a un conjunto de factores:

- Elevada capacidad de germinación.
- Habilidad para sobrevivir en condiciones muy adversas.
- Eficiencia en la utilización de nutrientes.
- Capacidad para modificar la rizosfera.
- Fuerte agresividad contra otros microorganismos.
- Eficacia para promover el crecimiento y los mecanismos de defensa de la planta (Benhamou y Chet., 1997).

El biocontrol es el resultado de diversos mecanismos en los que están implicados la planta, el patógeno, el ACB, la comunidad microbiana existente alrededor de la planta y el ambiente físico que los rodea (Handelsman y Stabb, 1996). Los mecanismos involucrados en el antagonismo de *Trichoderma* frente a otros hongos no sólo incluyen la competición por el espacio y los nutrientes, sino también su capacidad para producir y/o resistir a metabolitos que impiden la germinación de esporas (fungistasis), que matan células (antibiosis) o que modifican la rizosfera (Howell, 2003), sin olvidar el proceso de micoparasitismo en el que se da el contacto físico entre el patógeno y el ACB, la producción de enzimas hidrolíticas, toxinas y/o antibióticos y la inducción de las defensas de la planta y de su crecimiento.

3. Interacciones *Trichoderma*-planta.

A lo largo de esta introducción se ha puesto de manifiesto la importancia del género *Trichoderma* como agente de control biológico, pero este efecto beneficioso no se debe sólo a su actividad antagonista frente a organismos fitopatógenos, sino también a un efecto directo sobre las plantas y su ambiente. Estos efectos beneficiosos sobre las plantas incluyen la promoción del crecimiento, la tolerancia a estreses abióticos y la inducción de la respuesta defensiva frente a patógenos.

Las cepas de *Trichoderma* con reconocida influencia sobre las plantas deben ser buenas competidoras en la rizosfera y han de ser capaces de colonizar las raíces, lo que ha provocado que en los últimos años se les haya redefinido como endosimbiontes de plantas (Harman *et al.*, 2004). Según estos autores, las especies de *Trichoderma* actúan como

simbiontes de plantas, oportunistas y avirulentos, capaces de colonizar las raíces mediante mecanismos similares a los empleados por hongos micorrícicos y de producir compuestos que promueven el crecimiento de las plantas y/o inducen sus sistemas de defensa. Como simbiontes, reciben nutrientes de las plantas (a través de exudados de las raíces) y un nicho que colonizar, mientras que mejoran la toma de nutrientes por parte de las raíces y protegen a la planta frente a estreses tanto bióticos como abióticos (Woo y Lorito, 2006).

La colonización implica una habilidad de reconocimiento y adherencia a la raíz, la entrada del hongo en la planta y la resistencia a metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a esa invasión (Hermosa *et al.*, 2012). En estos procesos participan un gran número de enzimas y compuestos, como hidrofobinas y proteínas similares a expansinas en el reconocimiento y la adherencia (Viterbo y Chet, 2006; Brotman *et al.*, 2008) o endopoligalacturonasas en la degradación de la pared celular de plantas (Morán-Díez *et al.*, 2009). Las reacciones del hospedador frente a la invasión de *Trichoderma* suelen tener lugar en el sitio de entrada: las deposiciones de callosa engrosando la pared celular son muy eficaces a la hora de restringir el crecimiento del hongo a los espacios intercelulares de la epidermis y el córtex impidiendo su entrada al sistema vascular (Yedidia *et al.*, 1999). También se produce una acumulación de compuestos antimicrobianos, de naturaleza fenólica, sintetizados por la planta en el lugar de penetración del hongo. La capacidad de colonización depende en gran medida de la tolerancia del hongo a estos metabolitos, resistencia que en *Trichoderma* ha sido atribuida a la presencia de transportadores ABC (Ruocco *et al.*, 2009).

Diversos estudios (recogidos en Shores *et al.*, 2010) han revelado que la interacción *Trichoderma*-planta da lugar a cambios en el transcriptoma y proteoma de la planta. Los compuestos fúngicos implicados en la inducción de respuestas en la planta incluyen:

- **Enzimas hidrolíticas:** xilanasas, celulasas, endoquitinasas, etc. Inducen la expresión de proteínas relacionadas con defensa, la biosíntesis de fitoalexinas, el crecimiento de la raíz o la resistencia a enfermedades.
- **Peptaiboles:** son pequeños péptidos lineales (de entre 7 y 20 residuos) producidos por una péptido sintetasa no ribosomal. Se ha demostrado su actividad antimicrobiana y su capacidad para inducir respuestas de defensa en plantas.
- **Oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular:** inducen la expresión de proteínas relacionadas con patogenicidad (PR), la lignificación en el lugar de

la infección y la generación de ROS, y también reducen la respuesta defensiva en la planta.

3.1. Resistencia a estreses abióticos.

- **Estrés hídrico:** en condiciones normales, las plantas bajo estrés hídrico sufren cambios fisiológicos como el cierre de los estomas o la reducción de la tasa de fotosíntesis neta, lo que provoca, si ese estado de estrés se prolonga durante demasiado tiempo, una situación de hambruna, la parada del crecimiento y posiblemente la muerte del organismo. Las plantas tratadas con *Trichoderma* son mucho más resistentes a estados de déficit de agua. Este tratamiento provoca una serie de cambios en la planta perdurables a lo largo del tiempo, tales como la inducción del metabolismo de carbohidratos y de las proteínas implicadas en la fotosíntesis o el acúmulo de almidón en las hojas, lo que permite un mayor aporte de nutrientes y energía destinados a mantener el crecimiento de la planta (Bae *et al.*, 2009; Shoresh y Harman, 2008a).
- **Estrés salino:** el exceso de salinidad provoca en las plantas alteraciones del balance hídrico e iónico en los tejidos y estreses secundarios como el oxidativo (Munns, 1993). En general, *Trichoderma* puede alterar el estatus nutricional de las plantas, incrementando su contenido en potasio y calcio (dos de los principales elementos deficitarios en plantas bajo estrés salino) (Yedidia *et al.*, 2001; Yildirim *et al.*, 2006).
- **Estrés térmico:** se ha demostrado que las plantas de tomate sometidas a temperaturas extremas (tanto frío como calor) sufren menos daño si están tratadas con *T. harzianum* (Shoresh *et al.*, 2010).
- **Estrés oxidativo:** en condiciones de estrés severo, pueden acumularse ROS generando daños celulares. En estudios proteómicos de raíces inoculadas con *Trichoderma* se observan niveles aumentados de superóxido dismutasa, peroxidasa y otras enzimas de detoxificación de ROS (Shoresh y Harman, 2008a).

3.2. Otros efectos beneficiosos del tratamiento con *Trichoderma*.

- **Promoción del crecimiento:** el efecto de *Trichoderma* sobre el crecimiento tiene una larga duración, pudiendo incluso durar toda la vida de las plantas anuales (Harman, 2000). El tratamiento incrementa el crecimiento de raíces y tallos, el porcentaje de germinación, el contenido en peso seco, almidón y azúcares (Shoresh y Harman, 2008a).

Esta característica se ha comprobado en numerosos cultivos y plantas ornamentales, observándose un incremento en la altura, diámetro y/o peso seco de las plantas, así como en el porcentaje de germinación, número de botones florales y/o área de las hojas (Fig. 8). Para explicar esta estimulación del crecimiento se han sugerido varios mecanismos: la producción de factores de crecimiento, el control de patógenos menores, o la conversión de material no utilizable en formas que puedan ser asimiladas por las plantas. En el caso de algunas especies de *Trichoderma*, también podrían facilitar el efecto potenciador de bacterias saprófitas (Vrany *et al.*, 1990) y de hongos micorrícicos (Calvet *et al.*, 1993).

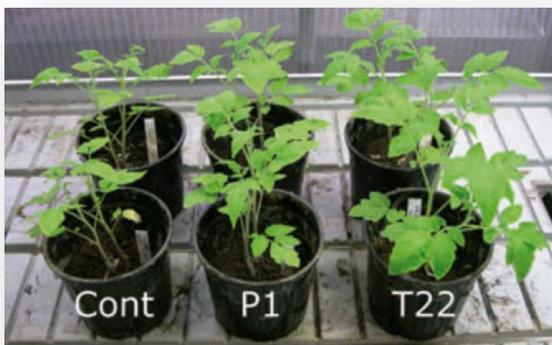


Figura 8. Efectos del tratamiento de plantas de tomate con diferentes cepas de *Trichoderma*. Cont: plantas sin tratar; P1: plantas tratadas con *T. atroviride*; T22: plantas tratadas con *T. harzianum*. Foto tomada de Tucci *et al.*, 2011.

- **Mejora de la eficiencia fotosintética:** la activación de las defensas de la planta por parte de *Trichoderma* tiene un coste metabólico elevado. Esta energía extra proviene del aumento de la capacidad fotosintética y de las tasas de respiración de la planta inducidas por *Trichoderma* (Shoresh y Harman, 2008b).
- **Aumento de la toma de nutrientes:** varias especies de *Trichoderma* son capaces de solubilizar nutrientes presentes en el suelo necesarios para la

planta, haciéndolos fácilmente asimilables por las raíces. Dentro de estos nutrientes se incluye el fósforo y micronutrientes como el hierro, cobre, zinc y magnesio (Altomare *et al.*, 1999).

- **Mejora de la eficiencia de utilización de nitrógeno:** *Trichoderma* induce la expresión de la nitrato reductasa en plantas, enzima que convierte el nitrato en iones amonio (necesarios para el metabolismo del nitrógeno), mejorando la productividad y el crecimiento vegetal (Harman, 2000).



Figura 9. Utilización estimada de productos agrícolas basados en *Trichoderma*. El tamaño de los puntos rojos indica la proporción relativa de esos productos en cada país. Imagen tomada de Lorito *et al.*, 2010.

Debido a todas estas cualidades positivas, el tratamiento de cultivos, tanto herbáceos como leñosos, o de plantas ornamentales con diferentes especies de *Trichoderma* está muy extendido en todo el mundo (Fig. 9), incluso en algunos países como Cuba o Venezuela su utilización está financiada por el gobierno, con el fin de reducir tanto los costes de la agricultura como el impacto ambiental provocado por pesticidas y fertilizantes químicos. Sin

embargo, todavía estamos muy lejos de explotar al máximo *Trichoderma* como hongo de biocontrol debido a la elevada variedad genética presente dentro del género que hace que algunas especies sean buenas promotoras del crecimiento e induzcan las defensas ISR, mientras que otras no tienen ningún efecto y algunas incluso tienen efectos negativos (Harman, 2006). Así pues, los efectos de *Trichoderma* varían dependiendo de la planta, e incluso del cultivar específico a tratar (Tucci *et al.*, 2011).

Una vez que los mecanismos implicados en la interacción *Trichoderma*-planta se conozcan completamente o al menos en mayor profundidad, se podrán definir los puntos clave que ha de cumplir una buena cepa de biocontrol, y se podrá utilizar de forma más generalizada y segura, obteniéndose mejores resultados tanto a nivel de producción como de resistencia y eliminación de enfermedades en los cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1 Organismos utilizados.

1.1 Hongos filamentosos.

***Trichoderma arundinaceum* IBT 40837 (Ta37)** (IBT: *Instituttet for Bioteknologi*, Denmark): cepa productora del trichoteceno harzianum A en la que no está descrita la producción de peptaiboles ni de hidrofobinas (Degenkolb *et al.*, 2008). Inicialmente fue descrita como *T. brevicompactum* IBT 40837 (Kraus *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005) pero se reclasificó mediante análisis genético y morfológico y en base al estudio de la producción de metabolitos secundarios (Degenkolb *et al.*, 2008). Fue aislada de suelo en Alshter, Irán.

***Trichoderma brevicompactum* IBT 40841:** cepa productora del trichoteceno trichodermina, también aislada de suelo en Alsher, Irán.

***Trichoderma harzianum* T34** (CECT 2413, *Colección Española de Cultivos Tipo*, Valencia, España) aislada a partir de suelo en EE.UU. (Hermosa *et al.*, 2000) y ***Trichoderma atroviride* T11** (IMI 35941, *International Mycological Institute*, Egham, UK) aislada de suelo en Francia. Ambas especies han sido reconocidas como cepas de biocontrol y, en este trabajo, han sido utilizadas como control positivo en experimentos de antagonismo frente a hongos fitopatógenos.

***Botrytis cinerea* B05-10** Pers.: Fr. [*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz]: cepa fitopatógena altamente virulenta, aislada de una viña con síntomas de la enfermedad conocida como *podredumbre gris* (Quidde *et al.*, 1999). Produce la fitotoxina botridial.

***Botrytis cinerea* B05-10 cnd15:** proviene de la cepa fitopatógena *B. cinerea* B05-10 en la que se ha silenciado el gen *bot2* (codifica para una sesquiterpeno ciclasa), dando como resultado la no producción de botridial (Quidde *et al.*, 1999) y la superproducción de ácidos botcánicos, manteniendo prácticamente intacta su virulencia frente a tomate y uva (Pinedo *et al.*, 2008).

***Rhizoctonia solani* CECT 2815:** hongo fitopatógeno aislado de plantas de alubia con síntomas de podredumbre en raíces y tallo. Empleada en ensayos de antagonismo.

***Myrothecium roridum* ATCC 52485:** (ATCC: *American Type Culture Collection*) cepa fitopatógena productora de trichotecenos macrocíclicos empleada en este trabajo para la realización de ensayos de antagonismo y para la obtención de sondas de genes *tri*. Utilizada en ensayos de antagonismo.

***Fusarium sporotrichioides* CECT 20166:** cepa fitopatógena productora del trichoteceno conocido como toxina T-2. Empleada, al igual que *M. roridum*, en ensayos de antagonismo y para la obtención de sondas de genes *tri*.

***Fusarium verticillioides* FRC M-3125 (=NRRL 20956):** (FRC: *Fusarium Research Center*, NRRL: *Northern Regional Research Laboratory*) cepa de *Fusarium* no productora de micotoxinas (Leslie *et al.*, 1992) utilizada para caracterizar la función del gen *tri4* de Ta37.

1.2 Cepas bacterianas.

***Agrobacterium tumefaciens* AGL1:** (Lazo *et al.*, 1991). Cepa utilizada en los experimentos de transformación de *T. arundinaceum*. Presenta resistencia natural a rifampicina (25-50 µg/ml) y a carbenicilina (100-200 µg/ml).

***Escherichia coli* DH5α:** (Hanahan, 1983). Cepa empleada en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta 5×10^8 transformantes/µg de ADN). Posee una delección en el gen *lacZ* del operón *lac*, susceptible de ser complementada por determinados vectores de clonación, como la serie de plásmidos pBluescript® (Stratagene, La Jolla, CA). Dicha complementación produce una coloración azul en la colonia, originada por la acción de la β-galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*) sobre el compuesto X-Gal, en presencia de IPTG.

***Escherichia coli* DH5α™- T1^R:** cepa utilizada para clonar fragmentos de ADN mediante el sistema TOPO TACloning® y que permite la selección por color sin necesidad de añadir al medio IPTG. Es resistente al bacteriófago T1. Incluida en el kit TOPO® TA Cloning (Invitrogen; Carlsbad, CA).

***Escherichia coli* XL1-Blue MRA (P2):** cepa lisógena para el fago P2, utilizada para detectar recombinantes Spi- derivados de vectores fágicos. Incluida en el kit lambda DASH® II/*Bam*HI vector (Stratagene; La Jolla, EE.UU.).

1.3 Levaduras.

***Kluyveromyces marxianus* ATCC 10606 (GK 1005):** Cepa utilizada en bioensayos debido a su sensibilidad a trichotecenos (ej. toxina T-2) (Beijerinck, 1908).

***Saccharomyces cerevisiae* INVSc1:** Cepa diploide de rápido crecimiento empleada en experimentos de expresión. Auxótrofa de histidina, leucina, triptófano y uracilo (genotipo: *MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*).

1.4 Material vegetal.

***Solanum lycopersicum* var. Marmande** (Semillas Batlle S.A., Barcelona, España). Variedad de tomate empleada en el estudio de los efectos fenotípicos producidos por el tratamiento con diferentes cepas de *Trichoderma*, el análisis del desarrollo de la enfermedad causada por *B. cinerea* y el estudio de los genes de resistencia en planta.

***Solanum lycopersicum* var. Tres Cantos** y ***Solanum lycopersicum* var. Muchamiel** (Rocalba S.A., Girona, España). Variedades de tomate utilizadas en el estudio de los efectos sobre el fenotipo producidos por el tratamiento con diferentes cepas de *Trichoderma* y la determinación del grado de desarrollo de la enfermedad producida por *B. cinerea*.

2 Vectores utilizados.

2.1 Vectores fágicos.

- **Lambda DASH[®] II** (Stratagene; La Jolla, EE.UU.) (43 Kb) (Fig.10). Se utilizó en la obtención de la genoteca de la cepa Ta37. Es un vector de sustitución que acepta fragmentos de ADN exógeno de entre 9 y 23 Kb. Está formado por tres regiones: un brazo izquierdo de 20 Kb, un brazo derecho de 9 Kb y una región *stuffer* en medio de ambos brazos de 12,5 Kb que será reemplazada por el ADN exógeno. Contiene dos regiones de clonación múltiple con sitios de restricción para enzimas como *SaI*, *EcoRI* y *BamHI*, entre otras. En los brazos se encuentran los extremos cohesivos o sitios *cos*, necesarios para el empaquetamiento del ADN en las cápsidas de los fagos. En la región *stuffer* de este vector se encuentran los genes *red* y *gam* (fenotipo Spi+), que hacen que estos fagos sean incapaces de formar placas de lisis en cepas de *E. coli* lisógenas de P2, mientras que los derivados recombinantes de lambda DASH II, al carecer de estos dos genes, sí son capaces de crecer en dichas cepas.

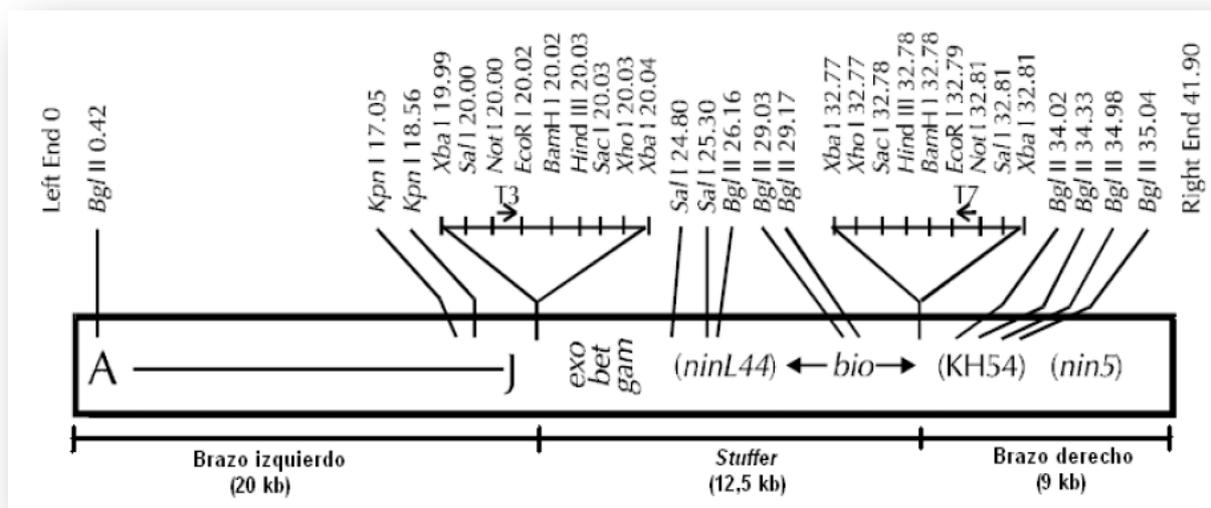


Figura 10. Mapa del vector lambda DASH[®]II. Representación de las 3 partes que lo constituyen así como de los sitios de corte para diferentes enzimas de restricción.

2.2 Vectores plasmídicos.

- **pCR[®]II-TOPO[®]** (Invitrogen; Carlsbad, CA) (4 Kb). Plásmido utilizado para la clonación de fragmentos de ADN. Permite la selección por resistencia tanto a kanamicina como a ampicilina al transformar en *E. coli*. Presenta dos orígenes de replicación: uno del plásmido pUC y otro de replicación monocatenaria del bacteriófago f1. Contiene un fragmento del gen *lacZ*, bajo el control de su propio promotor, capaz de complementar la mutación existente en el gen de la β -galactosidasa en algunas cepas de *E. coli*, dando un color azul a las colonias crecidas en presencia de X-Gal (sustrato que provoca la coloración azul al ser degradado por la β -galactosidasa). La presencia de un inserto de ADN en el fragmento del gen *lacZ* del plásmido evita la coloración azul de las colonias al no existir complementación, permitiendo la selección de los clones que contienen el inserto por el color. Permite la recuperación del inserto mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Se comercializa linearizado con una timina protuberante en los extremos 3', estando así especialmente indicado para clonación de fragmentos de PCR obtenidos mediante polimerasas "no proofreading" que dejan adeninas salientes en los extremos 5'.
- **pCR[®]4 Blunt TOPO[®]** (Invitrogen; Carlsbad, CA) (4 Kb). Plásmido muy similar al anterior excepto por carecer del origen de replicación del bacteriófago f1 y porque se comercializa linearizado con extremos romos. Se utilizó como base en las construcciones plasmídicas p Δ Tri4 y p Δ Tri5.

- **pBluescript®II KS/SK+** (Stratagene; La Jolla, EE.UU.) (2961 pb). Plásmido derivado del vector pUC19, utilizado para la clonación de fragmentos de ADN. Presenta dos orígenes de replicación: uno del plásmido pBR322 (colE1) de *E. coli* y otro de replicación monocatenaria del fago f1. Incluye el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E. coli*. Contiene un fragmento del gen *lacZ* (subunidad α) capaz de complementar la mutación existente en algunas cepas de *E. coli* en el gen de la β -galactosidasa, dando un color azul a las cepas crecidas en presencia de IPTG (inductor del gen *lacZ*) y X-Gal.
- **pAN52.1** (5721 pb) (Punt *et al.*, 1987). Plásmido utilizado para la expresión de genes bajo el control del promotor constitutivo del gen *gpdA* (codifica para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y del terminador del gen *trpC*, ambos de *Aspergillus nidulans*. Entre ambas regiones hay sitios de corte único para dos enzimas de restricción: *NcoI* y *BamHI*. Confiere resistencia a ampicilina al ser transformado en *E. coli*.
- **pAN7.1** (6756 pb) (Punt *et al.*, 1987). Plásmido que contiene un casete formado por el gen *hph* de *E. coli*, que confiere resistencia a higromicina B en hongos filamentosos, bajo el control del promotor del gen *gpdA* y del terminador del gen *trpC*, ambos de *A. nidulans*. Permite la selección por resistencia a ampicilina cuando se transforma en *E. coli*. Se utilizó para la sobreexpresión del gen *tri4* de Ta37 en *F. verticillioides*.
- **pUR5750** (15727 pb) (de Groot *et al.*, 1998). Plásmido derivado del vector pBin19, contiene un casete constituido por el gen *hph* de *E. coli* que confiere resistencia a higromicina B en hongos filamentosos. Este gen se expresa bajo el control del promotor del gen *gpdA* y del terminador del gen *trpC*, ambos de *A. nidulans*. Dicho casete se encuentra entre las regiones *left* y *right border* de pBin19. Permite la selección por resistencia a kanamicina cuando se transforma en *E. coli*. Se empleó en la transformación de *Trichoderma* mediada por *A. tumefaciens*.
- **pURS0** (13321 pb) (Cardoza *et al.*, 2006). Plásmido derivado del vector pUR5750 en el que se ha reemplazado un fragmento *EcoRI-HindIII* de 4 Kb que contenía el casete de resistencia a higromicina B por un fragmento *Ecl136II-HindIII* de 1,65 Kb con el casete que contenía el gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (confiere resistencia a fleomicina en hongos filamentosos) bajo el control del promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans* y del terminador del gen *CYC1* de *Saccharomyces cerevisiae* (dicho fragmento proviene del plásmido pJL43b1). Se empleó en la transformación de *Trichoderma* mediada por *A. tumefaciens*.
- **pYES2.1/V5-His-TOPO (URA3+)** (Invitrogen, Carlsbad, CA) (5,9 Kb). Plásmido utilizado para la expresión de genes en levaduras auxótrofas de uracilo. Se comercializa linearizado con una timina protuberante en los extremos 3', por lo que

admite la clonación de fragmentos con adeninas protuberantes. Permite la selección por resistencia a ampicilina en *E. coli* y por reversión de la auxotrofia de uracilo en levaduras ya que contiene al gen URA3 bajo el control de su propio promotor. Contiene 2 orígenes de replicación: uno para bacterias (pUC) y el otro para levaduras (origen de replicación del plásmido de 2 μ de levaduras). El fragmento clonado queda bajo el control del promotor T7 y del terminador del gen *CYC1* (citocromo 1 oxidasa). La proteína sintetizada en la célula transformada puede ser purificada fácilmente ya que a continuación del inserto se añade el epítipo V5 y una cola de 6 histidinas. La expresión del gen clonado se induce, en la cepa que lo contiene, por la presencia de galactosa en el medio de cultivo.

- **pSIL** (Sousa, 2004): (5,2 Kb). Plásmido empleado como base para el silenciamiento del gen *tri4* en Ta37. Deriva del pBluescript[®] SK(+) en cuyo corte *SmaI* se ha introducido un casete formado por el promotor del gen *tss1* seguido de un intrón de 150 pb, ambos de *T. harzianum* y el terminador del gen *cbh2* (celobiohidrolasa 2) de *T. reesei*. Entre el promotor y el intrón se encuentran los sitios de corte únicos *SpeI* y *BamHI* y entre el intrón y el terminador están los sitios *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* y *XhoI*.

2.3 Construcciones plasmídicas.

A lo largo del presente trabajo se construyeron diversos plásmidos cuya finalidad fue la expresión, silenciamiento o interrupción de genes de la cepa Ta37. A continuación se describe detalladamente el modo de obtención de cada uno de ellos (Fig. 11):

- **p Δ Tri4 / p Δ Tri5** (7,3 Kb). Estos plásmidos fueron utilizados para la interrupción en Ta37 de los genes *tri4* y *tri5*, respectivamente. Para su construcción se siguió la misma estrategia:

Mediante PCR, utilizando un par de oligonucleótidos que dejan un sitio de corte para la enzima *Ascl* en el extremo 3' y la *iProof high-fidelity* ADN polimerasa (Bio-Rad, Hercules, CA), se amplificó un fragmento interno de cada uno de los genes. Estos fragmentos fueron purificados a partir de un gel de agarosa utilizando el kit comercial Ultraclean DNA purification kit (MoBio, Carlsbad, CA) y clonados dentro del plásmido pCR4[®] Blunt TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos resultantes fueron digeridos con *Ascl* y ligados a un casete de expresión del gen de resistencia a higromicina B (2,5 Kb) (con extremos cohesivos compatibles con *Ascl* en ambos extremos) (Turgeon *et al.*, 1987), dando como resultado los plásmidos p Δ Tri4 y p Δ Tri5, ambos de 7,3 Kb. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada fragmento fueron los siguientes (anexo 1):

- Gen *tri4*: 2102/2103 (fragmento de 777 pb, desde el nucleótido 120 al 897).
- Gen *tri5*: 2100/2101 (fragmento de 784 pb, desde el nucleótido 54 al 837).

- **pURS4** (17,7 Kb). Este plásmido se empleó para silenciar el gen *tri4* en la cepa Ta37. Para ello se aisló un fragmento de 554 pb del gen *tri4* (que correspondía al segundo exón) mediante la digestión del plásmido pF42E4 (que contenía el gen completo) con las endonucleasas *Bam*HI y *Sac*I. Dicho fragmento fue tratado con la enzima klenow para rellenar los extremos, purificado a partir de gel utilizando el kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) y ligado con el plásmido pSIL (Sousa, 2004), previamente digerido con *Bam*HI, rellenado y desfosforilado. El plásmido resultante, pSIL*tri4*Sa, contenía una copia del fragmento interno del gen *tri4*. Este plásmido fue digerido con *Eco*RV, rellenado, desfosforilado y ligado de nuevo con el fragmento de 554 pb del gen *tri4*. Así se obtuvo el plásmido pSIL*tri4*SaSb que contenía dos copias del exón 2 del gen *tri4*, en orientaciones opuestas, separadas por un intrón de 150 pb, lo cual formaría una estructura de horquilla del ARN en la célula transformada, impidiendo por tanto la traducción de dicho ARN. Finalmente, para poder transformar el casete de silenciamiento en Ta37 mediante *A. tumefaciens*, el plásmido pSIL*tri4*SaSb fue digerido con *Sac*I, y el fragmento de 3,2 Kb resultante (que contenía el casete) fue ligado al vector pUR5750, previamente digerido con *Sac*I y desfosforilado, obteniéndose así el plásmido pURS4 de 17,7 Kb, el cual fue introducido por electroporación en la cepa de *A. tumefaciens* AGL1.

- **pSPT4-4** (11,7 Kb). Este plásmido se construyó para la expresión del gen *tri4* de la cepa Ta37 en *F. verticillioides*. El gen *tri4* de Ta37 se amplificó mediante PCR empleando la polimerasa de alta fidelidad *Pfu* (Fermentas, Vilnius, Lituania) y el par de oligonucleótidos 2096/2097 (anexo 1). El fragmento de 1791 pb fue fosforilado, purificado de gel utilizando el kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) y ligado con el plásmido pAN52.1 (Punt *et al.*, 1987), previamente digerido con *Bam*HI, rellenado y desfosforilado. El plásmido resultante contenía el casete de expresión del gen *tri4* de 4914 pb, compuesto por el gen *tri4* unido al promotor del gen *gpdA* y al terminador *trpC*, ambos de *A. nidulans*. Este casete fue aislado mediante digestión con las enzimas *Bgl*II y *Ehe*I, rellenado, purificado de gel y ligado con el plásmido pAN7.1 (Punt *et al.*, 1987), previamente digerido con *Hind*III, rellenado y desfosforilado, dando lugar a la construcción final pSPT4-4.

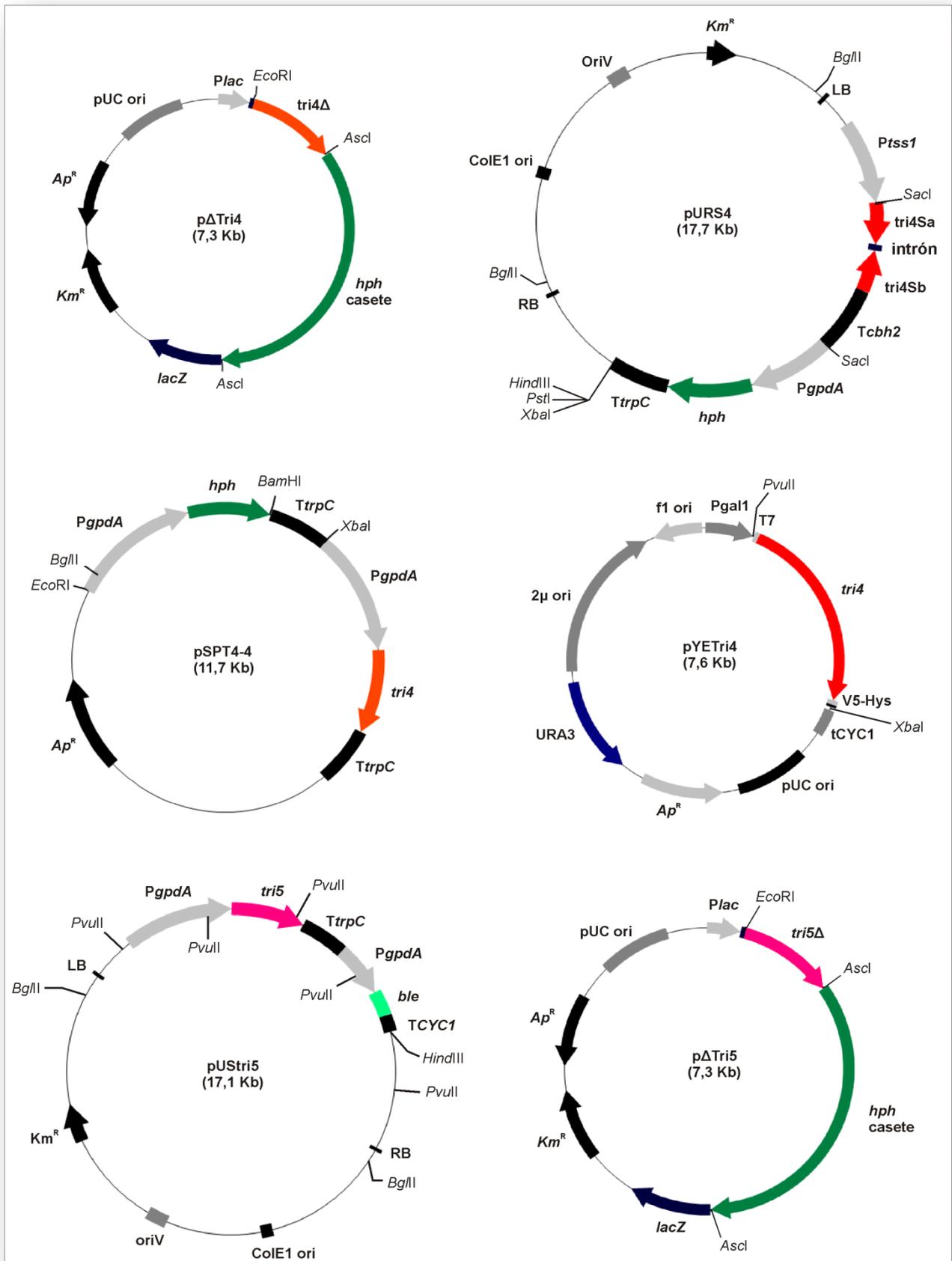
- **pYETri4 / pYETri5 / pYETri11**: Estos 3 plásmidos fueron utilizados para la expresión en levaduras de los genes *tri4*, *tri5* y *tri11*, respectivamente. En todos ellos se siguió la misma estrategia:
Mediante RT-PCR, utilizando como molde ARN de Ta37 y el kit comercial Superscript III one-step RT-PCR with *Platinum Taq* polymerase (Invitrogen, Carlsbad,

CA), se amplificaron cada uno de los genes. A estos fragmentos de ADN se les añadió una adenina protuberante en los extremos 3' (mediante un tratamiento con la *Taq* Polimerasa, Fermentas; Vilnius, Lithuania) y se purificaron de gel utilizando el kit comercial Ultraclean DNA purification kit (MoBio, Carlsbad, CA). Una vez purificados, se clonaron en el vector pYES2.1/V5-His-TOPO (*URA3+*) dando lugar a los plásmidos pYETri4 (7,6 Kb), pYETri5 (7,1 Kb) y pYETri11 (7,4 Kb). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada gen fueron los siguientes (anexo 1):

- Gen *tri4* (1791 pb): Tri437-5/Tri437-3b.
- Gen *tri5* (1226 pb): 2114/2115.
- Gen *tri11* (1580 pb): 2105/2106.

- **pUStri5** (17,1 Kb). Plásmido construido para la complementación del mutante interrumpido en el gen *tri5*. El gen *tri5* de Ta37 se amplificó mediante PCR empleando la polimerasa de alta fidelidad *Pfu* (Fermentas, Vilnius, Lituania) y el par de oligonucleótidos 2114/2115 (anexo 1). La banda de 1,2 Kb obtenida fue rellenada con la enzima Klenow, purificada de gel y clonada en el plásmido pAN52.1, previamente digerido con *Bam*HI, rellenado y desfosforilado. El plásmido resultante contenía el casete de expresión del gen *tri5* de 3,8 Kb, compuesto por el gen *tri5* unido al promotor del gen *gpdA* y al terminador *trpC*, ambos de *A. nidulans*. Este casete fue aislado mediante digestión con las enzimas *Stu*I y *Hind*III, rellenado, purificado de gel y ligado con el plásmido pURS0, previamente digerido con *Eco*RI, rellenado y desfosforilado, dando lugar a la construcción final pUStri5.

Figura 11. Vectores construidos en este trabajo. Abreviaturas empleadas: *Ap*^R.- gen de resistencia a ampicilina; *ble*.- gen de resistencia a fleomicina de *S. hindustanus*; *hph*.- gen de resistencia a higromicina B de *E. coli*; *Km*^R.- gen de resistencia a kanamicina de *E. coli*; *lacZ*.- gen de la β-galactosidasa de *E. coli*; LB/RB.- bordes izquierdo/derecho del ADN de transferencia (T-DNA); *Pgal1*.- promotor *Gal1* inducible por galactosa de *S. cerevisiae*; *PgpdA*.- promotor del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *A. nidulans*; *Plac*.- promotor del gen de la β-galactosidasa de *E. coli*; *Ptss1*.- promotor del gen de la trehalosa-6-fosfato sintasa de *T. harzianum*; T7.- promotor del bacteriófago T7; *Tcbh2*.- terminador transcripcional del gen de la celobiohidrolasa 2 de *T. reesei*; *TCYC1*.- terminador transcripcional del gen citocromo 1 oxidasa de *S. cerevisiae*; *TtrpC*.- terminador transcripcional del gen triptófano C de *A. nidulans*; *URA3*.- gen de la orotidin-5-fosfato descarboxilasa en levaduras implicado en la síntesis de uracilo; V5-Hys.- epitopos V5 + 6 histidinas. Los mapas de los plásmidos han sido generados empleando el software BVTech Plasmid.



3 Medios de cultivo.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en una olla a presión durante 20 min.

3.1 Medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos.

- **Medio Luria-Bertani** (LB; Miller, 1972):

Triptona	10 g	Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH. Medio sólido: 20 g/L de agar.
Extracto de levadura	5 g	
NaCl	10 g	
Agua mRO	hasta 1 litro	

- **NZY** (Miller, 1972): medio utilizado para el crecimiento de la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) infectada con el vector lambda DASH II, y para la posterior formación de placas de lisis:

NaCl	5 g	Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH. Medio sólido: 20 g/L de agar. Cobertera: 7 g/L de agar.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g	
Extracto de levadura	5 g	
NZ amina tipo A	10 g	
Agua mRO	hasta 1 litro	

- **SM**: medio empleado para el mantenimiento de los bacteriófagos.

NaCl	5,8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g
Tris HCl 1M , pH 7,5	50 ml
Gelatina al 2% (p/v)	5 ml
Agua mRO	hasta 1 litro

- **SOB**: medio empleado para la amplificación de células electroporadas de *E. coli*.

Triptona	20 g	Se ajustó el pH a 7,5 con KOH. Antes de ser utilizado se añadieron 20 ml/L de MgSO ₄ 1M (esterilizado por filtración).
Extracto de levadura	5 g	
NaCl	0,5 g	
Agua milliQ	Hasta 1 litro	

- **TB**: medio utilizado para el crecimiento de cepas de *E. coli* a partir de las cuales se querían aislar plásmidos por el método de lisis alcalina.

Triptona	12 g	En el momento de ser utilizado se añadieron 100 ml/L de una solución 170 mM de KH ₂ PO ₄ y 720 mM de K ₂ HPO ₄
Extracto de levadura	24 g	
Glicerol	4 ml	
Agua mRO	hasta 900 ml	

3.1.1 Medios de cultivo para *A. tumefaciens*.

- **MM:** medio mínimo de crecimiento de *A. tumefaciens* (Hooykaas *et al.*, 1979). Se prepararon y esterilizaron por separado las siguientes soluciones:

- Tampón fosfato potásico pH 7,0:

K ₂ HPO ₄	200 g
KH ₂ PO ₄	145 g
Agua mRO	hasta 1 litro

- Solución M-N:

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	30 g
NaCl	15 g
Agua mRO	Hasta 1 litro

- Elementos traza:

ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	100 mg
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	100 mg
MnSO ₄ . H ₂ O	100 mg
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	100 mg
Agua mRO	hasta 1 litro

Se ajustó el pH a 5,0.

- CaCl₂ . 2 H₂O 1% (p/v).
- Glucosa 50% (p/v).
- FeSO₄ 0,01% (p/v).
- NH₄NO₃ 20% (p/v).

Manteniendo las soluciones estériles, se mezclaron en las siguientes proporciones:

Tampón fosfato potásico pH 7,0	10 ml
Solución M-N	20 ml
CaCl ₂ . 2 H ₂ O 1% (p/v)	1 ml
FeSO ₄ 0,01% (p/v)	10 ml
Elementos traza	5 ml
NH ₄ NO ₃ 20% (p/v)	2,5 ml

Se enrasó con agua mRO hasta 996 ml y se ajustó el pH entre 7 y 8 con NaOH 5N. Para medio sólido se añadieron 15 g/L agar (Difco). Se esterilizó durante 20 min. Antes de usarse se añadieron 4 ml/L de glucosa al 50% (p/v) estéril.

- **MI: Medio de inducción de *A. tumefaciens*** (Hooykaas *et al.*, 1979). Se preparó mezclando las mismas soluciones que para el MM en las siguientes proporciones:

Tampón fosfato potásico pH 7,0	10 ml
Solución M-N	20 ml
CaCl ₂ · 2 H ₂ O 1% (p/v)	1 ml
NH ₄ NO ₃ 20% (p/v)	2,5 ml
MES (40 mM)	7,8 g
Glicerol 50%	10 ml

Se llevó a un volumen final de 981 ml con agua mRO y se ajustó el pH a 5,5. El medio líquido se esterilizó por filtración, o durante 20 min en olla a presión en el caso del medio sólido. En el momento de usarlo se añadieron 4 ml/L glucosa al 50% (p/v) (10mM), 5 ml/L de elementos traza, 10 ml/L de FeSO₄ 0,01% (p/v) y acetosiringona (AS, disuelta en etanol absoluto) a una concentración final de 200 µM (el pH final era de 5,3). Al medio sólido se añadió la mitad de glucosa de la que llevaba el medio de inducción líquido (5 mM), y se añadieron además 15 g/L de agar (Difco) antes de esterilizarlo.

3.2 Medios de cultivo para hongos filamentosos.

- **5- GYEP:** Se empleó como medio de cultivo de *Fusarium verticillioides*.

Glucosa	50 g
Extracto de levadura	1g
Peptona	1g
Agua mRO	hasta 1 litro

- **CM:** Se empleó como medio líquido general para el crecimiento de la cepa Ta37.

Extracto de malta	5 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	5 g
Agua mRO	hasta 1 litro

- **MEA:** Se usó como medio de cultivo de *Botrytis cinerea*.

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agua mRO	hasta 1 litro

Se ajustó el pH a 5,6 con NaOH 0,1N.

Para mejorar la esporulación, se añadió un 25% (p/v) de plantas de tomate trituradas.

- **Medio de regeneración:** Se empleó en los experimentos de transformación mediados por protoplastos. Se prepararon las siguientes soluciones por separado y, una vez estériles, se mezclaron (para 600 ml de medio):

- Solución 2X:

Extracto de levadura	0,6 g
Hidrolizado de caseína	0,6 g
Agar (Difco)	9,2 g
Agua mRO	hasta 200 ml

- 1,2 M Sacarosa: 164,3 g sacarosa en 400 ml agua mRO (se calienta el agua para ayudar a la disolución de la sacarosa, controlando que se mantenga el volumen final).

- **MMT** (Medio mínimo de *Trichoderma*, Penttilä *et al.*, 1987):

KH ₂ PO ₄	15 g	Se ajustó el pH a 5,5 con KOH.
Elementos traza (1000X) ¹	1 ml	
Agua mRO	hasta 920 ml	

¹ **Elementos traza (1000X):** 5 g FeSO₄ · 7H₂O; 1,6 g MnSO₄ · H₂O; 1,4 g ZnSO₄ · 7H₂O; 2 g CoCl₂, en 1 litro de agua mRO.

Una vez estéril, se añadieron:

Glucosa 50%	4 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ 250 mg/ml	2 ml
CaCl ₂ 1M	410 µl
MgSO ₄ 1M	240 µl

- **PDA:** Se empleó como medio general para el crecimiento de hongos filamentosos.

PDB (<i>Potato Dextrose Broth</i>) (Difco)	24 g
Agar	25 g
Agua mRO	hasta 1 litro

- **PDBs** (Nielsen *et al.*, 2005): Se utilizó como medio de producción de HA.

PDB (Difco)	24 g
Elementos traza (1000X) ¹	1 ml
Agua mRO	hasta 1 litro

¹ **Elementos traza (1000X):** 1 g de ZnSO₄ + 0,5 g de Cu₂SO₄ en 100 ml de agua mRO.

- **PPG** (Sousa, 2004): Se empleó como medio sólido de crecimiento y de esporulación de Ta37.

Puré de patata (Maggy®)	20 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua mRO	hasta 1 litro

- **TSA**: Se utilizó como medio de selección en los experimentos de transformación mediados por *A. tumefaciens*. Dependiendo del vector utilizado, se suplementó con higromicina B (100 µg/ml) o fleomicina (50 µg/ml), y cefotaxima (300 µg/ml) en ambos casos.

TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>) (Merck)	30 g
Agar (Difco)	15 g
Agua mRO	hasta 1 litro

- **V-8 Juice agar**: Se utilizó como medio de crecimiento y mantenimiento de *F. verticillioides*.

Zumo V-8 (Campbell) ¹	200 ml
CaCO ₃	3 g
Agar	20 g
Agua mRO	hasta 1 litro

¹ El zumo V-8 contiene: tomate, zanahoria, pepino, lechuga, espinacas, remolacha, perejil y berro.

Se disuelve primero el CaCO₃ y después se añade el zumo V-8 para facilitar la disolución de los componentes del medio.

3.3 Medios de cultivo para levaduras.

- **MD**: Medio empleado durante la transformación de *S. cerevisiae* INVSc1. Se prepararon por separado las siguientes soluciones:

- Sales (100 ml):

(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
MgSO ₄	2,43 g
NaCl	1 g

- Elementos traza (100 ml):

H ₃ BO ₃	10 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	10 mg
KI	100 mg
FeCl ₃	30 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	70 mg

- Buffer (100 ml):

K ₂ HPO ₄	5,75 g
KH ₂ PO ₄	4,58 g

- Vitaminas (100 ml):

Biotina	0,2 mg
Tiamina-HCl	40 mg
Piridoxina-HCl	40 mg
Inositol	20 mg
D-Ca-Pantotenato	40 mg
Riboflavina	20 mg
Niacina	40 mg
Ácido p-aminobenzoico	20 mg

Una vez estériles se mezclaron en las siguientes proporciones:

Sales	10 ml
Buffer	10 ml
CaCl ₂ · 2 H ₂ O 10% (p/v)	1 ml
Elementos traza	0,1 ml
Vitaminas	1 ml
Dextrosa	20 g
Agua mRO	hasta 1 litro

Aminoácidos con los que se suplementó el medio según las necesidades de la cepa:

Leucina	1 g/L
Histidina	200 mg/L
Triptófano	200 mg/L

- **YD:** Medio utilizado para el crecimiento de *S. cerevisiae* INVSc1.

Extracto de levadura	10 g	Medio sólido: 15 g/L de agar.
Peptona	20 g	
Glucosa	20 g	
Agua mRO	hasta 1 litro	

- **Medio rico en galactosa:** utilizado para la expresión en levaduras de genes clonados en el vector pYES2.1.

Extracto de levadura	10 g	La galactosa se esterilizó por separado y se añadió en el momento de su utilización.
Peptona	20 g	
Galactosa	20 g	
Agua mRO	hasta 1 litro	

- **MA:** Empleado para el crecimiento general de *K. marxianus* y para la realización de bioensayos.

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agua mRO	hasta 1 litro

Fue utilizado tanto en estado líquido como sólido, con 2 concentraciones diferentes de agar: 1% (para bioensayos) y 2 % (para crecimiento general).

3.4 Medios de cultivo para plantas.

- **MS** (Murashige y Skoog, 1962): medio empleado en cultivos hidropónicos.

Medio MS básico ¹	4,9 g	Se ajustó el pH a 5,7 con KOH. Para medio sólido se añadieron 8 g/L de agar.
Sacarosa	10 g	
MES	500 mg	
Agua mRO	hasta 1 litro	

¹ **Medio MS básico** (Sigma-Aldrich): contiene micro-, macroelementos y vitaminas.

- **Sustrato Kekkilä 50/50** (Projar S.A., Valencia, España): utilizado para el cultivo de plantas de tomate en una cámara de crecimiento. Composición: 90% materia orgánica (cáscara de coco

y turba), 10% ceniza; 0,2% nitrógeno; 0,1% fósforo total; 0,5% calcio; 0,1% magnesio; 0,2% hierro y 1,5 mg/kg cloruro; pH 5,5 – 6,6.

- **Fertilizante soluble en agua 20+20+20** (Scotts, Marysville, OH, EE.UU.): empleado para regar las plantas de tomate a una concentración final en agua de 1 g/L. Composición: 20% nitrógeno; 20% anhídrido fosfórico; 20% óxido de potasio; Oligoelementos: 0,02% boro, 0,015% cobre, 0,12% hierro, 0,01% molibdeno, 0,015% zinc.

4 Reactivos empleados.

4.1 Reactivos químicos de uso general.

Los reactivos utilizados a lo largo del presente trabajo fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU.), Difco Laboratories Inc. (Detroit, MI, EE.UU.), Fluka Chemika-Biochemika (Buchs, Suiza), GE Healthcare Bio-Sciences Corp. (Piscataway, NJ, EE.UU.), Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, EE.UU.), InvivoGen (San Diego, CA, EE.UU.), Kodak (Rochester, NY, EE.UU.), MBI Fermentas (Vilnius, Lituania), Merck (Darmstadt, Alemania), Millipore Corp. (Bedford, MA, EE.UU.), Oxoid Ltd. (Hampshire, UK), Panreac (Barcelona, España), Pronadisa (Madrid, España), QUIAGEN (Hilden, Alemania), Roche Diagnostics Corp. (Indianapolis, IN, EE.UU.), Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.), Tetenal (Norderstedt, Alemania), USB™ (Cleveland, OH, EE.UU.), VWR (Radnor, PA, EE.UU.).

4.2 Reactivos específicos para biología molecular.

4.2.1 Enzimas de restricción y modificación de ácidos nucleicos.

La mayoría de las enzimas utilizadas a lo largo de este trabajo fueron adquiridas a la casa comercial Fermentas (Vilnius, Lituania): **enzimas de restricción, enzima klenow, fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP), polinucleótido kinasa (PNK), ADN ligasa del fago T4, desoxirribonucleasa I (ADNasa I), ribonucleasa A (ARNasa A) y las ADN polimerasas *Taq* y *Pfu*.**

Ocasionalmente se adquirieron algunas enzimas de restricción a la casa comercial Roche (Basilea, Suiza).

4.2.2 Enzimas de digestión de membranas y paredes celulares.

La **lisozima** de clara de huevo fue suministrada por Fluka Chemika-Biochemika Co (Buchs, Suiza). Se empleó para la digestión de las paredes celulares bacterianas.

Las **enzimas líticas** (*lysing enzymes*) de *Trichoderma harzianum*, la **driselasa** y la **quitinasa** fueron adquiridas a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Se utilizaron para la obtención de protoplastos de Ta37.

4.2.3 Sistemas comerciales (kits).

Algunos de los procedimientos descritos en esta memoria fueron realizados mediante kits comerciales que incluyen todos los componentes necesarios para las reacciones:

DIG DNA Labeling Kit (Roche, Basilea, Suiza): permite el marcaje de sondas de ADN con digoxigenina-UTP mediante la amplificación *in vitro* del fragmento deseado utilizando nucleótidos marcados y la enzima klenow.

Express SYBR[®] Green qPCR Supermix Universal (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y **Power SYBR[®] Green PCR Master Mix** (Applied biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.): utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real usando ADNc como molde. Utiliza el reactivo ROX como referencia interna de fluorescencia.

GFX[™] Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, UK.): sistema de columnas que permite la purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos de 1,5-3 ml. Se empleó en la obtención de plásmidos destinados a secuenciación.

GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK.) y **Ultraclean[®] Microbial DNA Isolation kit** (MoBio, Carlsbad, CA, EE.UU.): sistemas de columnas que permiten el aislamiento, purificación y concentración de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Gigapack[®] III Gold Packaging Extract (Stratagene; La Jolla, EE.UU.): utilizado para el empaquetamiento de bacteriófagos lambda recombinantes con una alta eficiencia.

Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y **Superscript III one-step RT-PCR with Platinum Taq polymerase** (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.): utilizados en la obtención de ADNc de simple cadena con colas de poliA a partir de una mezcla de ARN total.

Terra[™] PCR Direct Polymerase Mix (Clontech, CA, EE.UU.): permite la amplificación de fragmentos de ADN directamente a partir de muestras de micelio, sin necesidad de aislar el ADN previamente.

TOPO[®] TA Cloning[®] Kit y **Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning kit** (Invitrogen; Carlsbad, CA, EE.UU.): sistemas rápidos de clonación de fragmentos de ADN con una adenina protuberante en el extremo 3' o de extremos romos, respectivamente.

4.2.4 Antibióticos y otros compuestos.

Ampicilina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.): se preparó una solución stock a 200 mg/ml en agua MilliQ, se alicuoteó y se almacenó a -20°C. Para su uso se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 100 µg/ml.

Kanamicina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.): se preparó una solución stock a 100 mg/ml en agua MilliQ, se alicuoteó y se almacenó a -20°C. A partir de este stock, se añadió al medio a una concentración final de 100 µg/ml.

Higromicina B (InvivoGen; San Diego, CA, EE.UU.): se preparó una solución stock a 100 mg/ml en agua MilliQ, se alicuoteó y se almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 100-200 µg/ml en el medio.

Fleomicina (InvivoGen; San Diego, CA, EE.UU.): se preparó una solución stock a 20 mg/ml en agua MilliQ, se alicuoteó y se almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 50-100 µg/ml en el medio.

Cefotaxima (Laboratorios Normon, S.A.): adquirida en forma de preparado farmacéutico. Se preparó una solución stock a 200 mg/ml en agua MilliQ, se alicuoteó y almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 300 µg/ml en el medio.

Carbenicilina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.): se preparó una solución stock a 100 mg/ml en agua MilliQ, se alicuoteó y almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 100 µg/ml en el medio.

IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido; Fermentas; Vilnius, Lituania): se preparó una solución stock a 100 mM en agua MilliQ, se alicuoteó y se almacenó a -20°C. En el medio de cultivo se usó a una concentración final de 50 nM.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, Fermentas; Vilnius, Lituania): se preparó una solución stock a 20 mg/ml en agua MilliQ, se alicuoteó y almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 40 µg/ml en el medio.

4.2.5 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados a lo largo de este trabajo fueron adquiridos a la empresa Isogen Life Science (De Meern, Holanda) en forma de liofilizado. En el laboratorio fueron disueltos en agua MilliQ a una concentración de 200 µM.

El software OligoPerfect® Designer (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) fue utilizado para diseñar los oligonucleótidos destinados a experimentos de PCR a tiempo real, con las siguientes características: tamaño ideal de 20 pb y tamaño del fragmento amplificado de entre 80 y 250 pb.

En el anexo 1 se muestran todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

4.2.6 Marcadores de peso molecular.

El ADN del fago lambda fue suministrado por Fermentas (Vilnius, Lituania). Se preparó a una concentración de 100 ng/ml y, una vez digerido con las enzimas de restricción *HindIII* o *PstI*, fue utilizado como marcador de tamaño en geles de agarosa. Los fragmentos de ADN obtenidos como resultado de la digestión del fago lambda fueron los siguientes:

- *NHindIII*: 23.130; 9.416; 6.557; 4.361; 2.322; 2.027; 564; 125 pb.
- *NPstI*: 11.509; 5.080; 4.649; 4.505; 2.840; 2.577; 2.454; 2.443; 2.140; 1.980; 1.700; 805; 516; 467; 448; 339; 265; 247; 210 pb.

5 Instrumental.

El instrumental empleado para la realización de los experimentos a lo largo de este trabajo fue suministrado por las siguientes casas comerciales:

Applied Biosystems (Carlsbad, CA, EE.UU.): aparato de PCR a tiempo real Step One Plus System 2000, equipado con el software Step One™ v2.0. Placas para qPCR MicroAmp® Fast 96-well Reaction Plate (0,1 ml) y cubiertas adhesivas ópticas.

ASL s.a. Ibercex (Madrid, España): cámara de crecimiento de plantas modelo Gresal 2D.

Beckman Coulter (Brea, CA, EE.UU.): ultracentrífuga modelo L8-70M.

Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, EE.UU.): cubetas de electroforesis para ácidos nucleicos (equipos SubCell®GT y mini Suc-Cell®GT) y fuentes de alimentación para cubetas de electroforesis Power Pac Basic y Power Pac 300. Equipo de fotografiado de geles de agarosa Gel Doc 1000. Electroporador Gene Pulser XCell™.

Bruker (Billerica, MA, EE.UU.): espectrómetros AMX 500 y WM 500 para NMR.

Buchi Labortechnik AG (Flawil, Suiza): bomba de vacío modelo V-700 equipada con el controlador V-850. Rotavapor R-3000.

Crison (Barcelona, España): pHmetro GLP22.

Eppendorf (Hamburgo, Alemania): microcentrífugas de mesa modelos 5415 y 5424, microcentrífuga refrigerada modelo 5417R, centrífuga refrigerada modelo 5810R. Thermomixer modelo comfort 1,5 ml. Termociclador modelo Mastercycler gradient. Pipetas automáticas de los tipos P2, P10 y P5000. Bomba de vacío modelo XF54 230 50.

Flores Valles S.A. (Madrid, España): vitrina de gases modelo LVG-150-GKS.

GE Healthcare Bio-Sciences Corporation (Piscataway, NJ, EE.UU.): filtros de nylon Hybond y películas de autorradiografía del tipo Hiperfilm-MP. Estuche para la exposición de films autorradiográficos Hypercassette™.

Gilson Medical Electronics Inc. (Middletown, WI, EE.UU.): micropipetas automáticas de los tipos P20, P200 y P1000.

Hamilton Co. (Reno, NV, EE.UU.): jeringas de inyección para HPLC de 100 µl y 1 ml.

Heidolph (Kelheim, Alemania): plataforma agitadora Duomax 1030.

Hewlett Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.): equipo de cromatografía de gases Hewlett Packard 6890 acoplado a un detector de masas HP5973. Columna de cromatografía de gases HP-5MS de dimensiones 30 x 0,25 mm.

Hoefler (Holliston, MA, EE.UU.): transiluminador Macrovue UV-25.

Jouan (St-Herblain, Francia): arcón de -80°C VX 350 series 2.

JVC (Yokohama, Japón): cámara de video para microscopio modelo TK-C1380.

Leica (Wetzlar, Alemania): lupa Zoom 2000. Microscopio óptico con contraste de fases DMLB.

Maissa (Barcelona, España): filtros de poliamida Nytal.

Memmert (Helibronn, Alemania): baños de agua WB 14L.

Millipore Corp. (Bedford, MA, EE.UU.): equipos de filtración de agua RiOs 5 y MilliQ gradient A10. Filtros Millex[®]-GV de PVDF y filtros de nitrocelulosa GSWP, ambos de 0,22 µm de diámetro de poro, para soluciones acuosas. Filtros Millex[®]-FG de PTFE y 0,20 µm de diámetro de poro para solventes orgánicos. Membranas negras de nitrocelulosa y 0,8 µm de diámetro de poro para el crecimiento de microorganismos.

New Brunswick Scientific (Enfield, CT, EE.UU.): incubador orbital modelo Innova 4000.

Olympus (Tokio, Japón): Microscopio invertido IX50.

Sanyo (Osaka, Japón): microondas modelo Expert BAO EM-D993. Congelador -30°C.

Sartorius (Goettingen, Alemania): balanza BL 610.

Scaltec (Goettingen, Alemania): balanza de precisión SBA 32.

Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY, EE.UU.): homogeneizador Disruptor Genie SI-D236.

Selecta (Barcelona, España): presoclave modelo 75. Baños de agua agitadores Unitronic-OR. Baño de ultrasonidos Ultrasons. Estufas de cultivo de microorganismos Incubat 2000 80L.

Sorvall (Newtown, CO, EE.UU.): centrífuga refrigerada modelo RC 5C Plus equipada con los rotores SS-34 y SLA-1500.

Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.): fijador de ADN UV Stratalinker[®] 1800.

Telstar (Terrassa, España): liofilizador Cryodos-50. Cabinas de flujo laminar AV-30/70 y Bio-II-A.

Thermo Fisher Scientifics (Wilmington, DE, EE.UU.): espectrofotómetro NanoDrop 1000. SpeedVac modelo Savant ISS110.

Unicam (Cambridge, UK): espectrofotómetro UV-vis Helios Gamma.

Varian Medical Systems Inc. (Palo Alto, CA, EE.UU.): espectrofotómetro Cary 50 Probe UV-Vis.

Velp Scientifica (Usmate, Italia): vórtex 2x3. Agitadores magnéticos termostatizables ARE.

Waters (Mildford, MA, EE.UU.): equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) compuesto por una bomba binaria modelo Waters 600 equipado con un detector de fotodiodo 996, una bomba de vacío modelo In-line degasser AF y un colector de fracciones modelo III. Sistema de inyección manual (rheodyne). Equipado con el software Millennium[®]32.

Gallenkamp (Leicestershire, UK): incubadores orbitales para matraces.

Whatman Laboratory Products Inc. (Clifton, NJ, EE.UU.): papel 3MM.

YMC Waters (Mildford, MA, EE.UU.): columna semipreparativa para HPLC ODS-H80 de dimensiones 150 x 10 mm, tamaño de partícula de 4 µm con un tamaño de poro de 8 nm. Columna analítica para HPLC ODS-H80 de dimensiones 150 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 4 µm con un tamaño de poro de 8 nm.

MÉTODOS

6 Cultivo y mantenimiento de los organismos.

6.1 Hongos filamentosos.

6.1.1 *T. arundinaceum*.

6.1.1.1 *Obtención de esporas.*

Se creció el hongo en medio PPG a 28°C y en oscuridad durante 10-12 días. Se añadieron 5 ml de agua destilada estéril y se raspó la superficie de la placa con ayuda de una pipeta de vidrio estéril. Esta suspensión de esporas se filtró a través de un filtro de nylon de 30 µm de diámetro de poro (nytal) para eliminar los restos de micelio. Las esporas se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril y se guardaron a 4°C hasta su uso (para periodos de tiempo cortos).

6.1.1.2 *Obtención de micelio para extracción de ADN.*

En un matraz de 500 ml se inocularon 100 ml de medio CM con 1×10^7 esporas/ml de *T. arundinaceum* y se incubó 24h a 28°C y 250 rpm. El contenido del matraz se filtró a través de nyal y se hizo un lavado con NaCl 0,9%. El micelio obtenido se secó presionándolo entre papeles de filtro, se liofilizó durante unas 10-12 horas y se guardó a -80°C hasta su uso.

6.1.1.3 *Obtención de micelio para extracción de ARN o proteínas y de sobrenadante para análisis de compuestos.*

Se hizo un preinóculo en CM como se indica en el apartado 6.1.1.2. Transcurridas las 24h, se tomaron 20 ml del preinóculo y se añadieron a 100 ml de medio PDBs. Se incubó a 28°C y 250 rpm. Para la extracción de ARN o proteínas, se filtró el contenido del matraz a través de nyal y se hizo un lavado con NaCl 0,9% (en el caso de ARN, tratado con un 0,1% (v/v) de dietil pirocarbonato, DEPC). El micelio obtenido se secó lo máximo posible presionándolo entre papeles de filtro y se almacenó en un arcón a -80°C hasta su uso. El sobrenadante filtrado se guardó a -20°C hasta su procesado.

6.1.2 Otros hongos.

El resto de hongos se crecieron a 28°C en oscuridad durante 7 días en medio PPG (para *T. harzianum* T34), en medio PDA (para *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides*, *M. roridum* y *R. solani*) o en medio MEA (en el caso de *B. cinerea*).

6.1.3 Mantenimiento.

Para periodos cortos de tiempo (máximo un mes), las cepas se mantuvieron en placas de medio sólido selladas con Parafilm™ a 4°C. Para preservar la viabilidad de las cepas durante periodos de tiempo más largos, se recogieron las esporas con agua estéril, se filtraron para eliminar los restos de micelio a través de nytal y se conservaron a -80°C en glicerol al 50% (excepto *B. cinerea* que se conservó en glicerol al 80%).

6.2 Cepas bacterianas.

6.2.1 Cultivo.

Las diferentes cepas de *E. coli* se crecieron en placas de medio LB sólido a 37°C durante al menos 12 h. Para cultivos en medio líquido, se inocularon 100 ml de medio LB o TB con una colonia aislada a partir de medio sólido y se incubaron en un matraz de 500 ml a 37°C a 250 rpm durante 16-18 h.

Para la selección de transformantes, el medio se suplementó con antibióticos y otros compuestos a las concentraciones finales indicadas en el apartado 4.2.4.

6.2.2 Mantenimiento.

Para periodos cortos de tiempo (2-3 semanas), las diferentes cepas se mantuvieron en placas de LB selladas con Parafilm™ a 4°C. Para su conservación a largo plazo, se prepararon suspensiones bacterianas en glicerol al 50% y se almacenaron a -80°C.

6.3 Plantas de tomate.

Las plantas de tomate se cultivaron en sustrato el Kekkilä 50/50 (Projar S.A., Valencia, España) (ver apartado 3.4.) en una cámara fitotécnica durante un máximo de 4 semanas bajo las siguientes condiciones: $21,5 \pm 2$ °C, 60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 h (luz fluorescente).

7 Análisis y manipulación de ácidos nucleicos.

7.1 Determinación de la concentración de ácidos nucleicos.

La concentración de los ácidos nucleicos se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de una solución en agua o tampón TE 1X a 260 nm, longitud de onda a la que las bases

nitrogenadas presentan un máximo de absorción. Una unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/ml de ADN de doble cadena, a 33 µg/ml de ADN de cadena simple o a 40 µg/ml de ARN.

Para estimar el grado de pureza del ácido nucleico con respecto a la presencia de proteínas u otros contaminantes, se utilizó el valor de la relación de absorbancia 260/280 (se considera puro cuando esa relación es $\geq 1,8$ para ADN y ≥ 2 para ARN; Sambrook y Russell, 2001), ya que 280 nm es la longitud de onda a la que absorben las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos.

En algunos casos la concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó con ayuda del NanoDrop (Thermo Fisher Scientifics, DE, EE.UU.)

7.2 Análisis y manipulación de ADN.

7.2.1 Limpieza y precipitación de ADN.

La eliminación de proteínas y otras impurezas de las soluciones de ADN se llevó a cabo mediante el proceso conocido como fenolización seguido de la precipitación del ADN.

- ⊕ Añadir a la solución de ADN un volumen igual de fenol neutro¹ y agitar por inversión varias veces hasta que la mezcla quede homogénea. Centrifugar durante 2 min a 13.200 rpm y temperatura ambiente.
- ⊕ Recuperar la fase acuosa (superior) cuidadosamente y añadir 0,5 volúmenes de fenol neutro y 0,5 volúmenes de CIA². Agitar y centrifugar de nuevo. Recoger la fase acuosa.
- ⊕ Repetir la adición de fenol-CIA las veces necesarias hasta que la interfase formada quede completamente limpia.
- ⊕ A continuación, añadir 1 volumen de CIA para eliminar los restos de fenol. Agitar y centrifugar de nuevo. Recoger la fase acuosa.
- ⊕ Para precipitar el ADN, añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 (o pH 7 cuando se trata de ADN genómico) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (enfriado a -20°C). Mezclar por inversión y mantener al menos 2 h a -20°C o 30 min a -80°C.
- ⊕ Centrifugar durante 30 min a 13.200 rpm y 4°C y eliminar el sobrenadante.
- ⊕ Lavar el precipitado con etanol al 70%. Centrifugar a 13.200 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Retirar todo el etanol y dejar secar el precipitado.
- ⊕ Finalmente, resuspender en agua MilliQ o tampón TE³ y conservar a 4°C o -20°C.

¹ **Fenol neutro:** se prepara una solución saturada de fenol en agua mRO (fenol ácido). Se mezclan por agitación fuerte 3 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1M pH 8. Se deja reposar hasta que se separen las fases, se elimina la fase superior y se vuelve a añadir 1 volumen de Tris-HCl 1M pH 8. Se agita vigorosamente, se deja reposar y se mide el pH de la fase superior, que ha de ser cercano a 7,5, y se guarda a 4°C en un recipiente opaco.

² **CIA:** cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).

³ **TE:** Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0.

7.2.2 Extracción de ADN total de hongos filamentosos.

Dependiendo de la cantidad de ADN que se necesite, se llevó a cabo una extracción a pequeña escala (en microtubos de 2,2 ml) o a gran escala (tubos de 10 ml). El protocolo es el mismo, adecuando los volúmenes de las soluciones a añadir.

- ⊙ Obtener el micelio como se indica en el apartado 6.1.1.2.
- ⊙ Romper el micelio liofilizado en un mortero hasta obtener un polvo fino, introducir en un microtubo de 2.2 ml hasta la línea de 0,5 ml y añadir 0,5 ml de tampón de rotura¹, 0,5 ml de fenol neutro y 0,5 ml de CIA, agitar para homogeneizar y resuspender el micelio, manteniendo en hielo las muestras en el caso de aislar el ADN total de más de una cepa.
- ⊙ Una vez completadas todas las muestras, incubar a 50°C durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos para mantener homogéneas las muestras. Pasado ese tiempo, centrifugar a 13.200 rpm y 4°C durante 20 minutos.
- ⊙ Recoger la fase acuosa (superior), pasar a un microtubo nuevo y añadir una vez más un volumen de fenol neutro-CIA, mezclar suavemente y centrifugar de nuevo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Llevar a cabo una última extracción con 1 volumen de CIA.
- ⊙ Precipitar el ADN presente en la fase acuosa con 1/10 de volumen de AcNa 3 M, pH 7.0 y con 2,5-3 volúmenes de etanol absoluto (enfriado a -20°C) y mantener a -20°C al menos 2 h.
- ⊙ Finalmente, centrifugar a 13.200 rpm y 4°C durante 30 min, lavar el precipitado con etanol al 70% y resuspender el ADN en un volumen no mayor de 100 µl de TE. Una vez resuspendido el ADN, guardar a 4°C.

¹ **Tampón de rotura:** Tris-HCl 200 mM pH 8.0; EDTA 100 mM pH 8.0; SDS 1% (el SDS se añadió al tampón justo en el momento de uso).

7.2.3 Extracción de ADN de levaduras.

- ⊙ Con un palillo estéril, tomar parte de una colonia de la levadura y resuspenderla en 1 ml de agua MilliQ.
- ⊙ Añadir unos 300 µl de perlas de vidrio estériles y agitar en el homogeneizador Disruptor Genie SI-D236 durante 2 min.
- ⊙ Recoger el sobrenadante y utilizar 5 µl para su análisis por PCR.

7.2.4 Aislamiento de ADN plasmídico.

En función del grado de pureza, de la cantidad de ADN o de la finalidad de la extracción, se llevaron a cabo 3 procedimientos de extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.

7.2.4.1 Lisis alcalina.

Este protocolo se utilizó para la obtención de plásmidos a gran escala a partir de células de *E. coli*. El método fue esencialmente el descrito por Maniatis *et al.*, 1982.

- ⊙ Inocular con una colonia aislada de *E. coli* en 100 ml de medio TB suplementado con el antibiótico adecuado e incubar durante 12 a 15 h a 37°C y 250 rpm.
- ⊙ Recoger las células por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min y resuspenderlas en 2 ml de GTE¹. Añadir otros 2 ml de GTE con lisozima a 10 mg/ml de concentración final. Mezclar bien y mantener a temperatura ambiente durante 5 min.
- ⊙ Añadir 8 ml de solución alcalina/SDS² recién preparada. Mezclar suavemente por inversión y mantener 10 min en hielo.
- ⊙ Añadir 6 ml de solución de acetato potásico 3M pH 4.8³ previamente enfriada a 4°C. Mezclar vigorosamente y mantener en hielo otros 15 min.
- ⊙ Centrifugar durante 10 min a 15.000 rpm y 4°C. Recuperar el sobrenadante, añadir 0,7 volúmenes de isopropanol y mezclar suavemente por inversión. Mantener 15 min a 37°C.
- ⊙ Centrifugar durante 10 min a 8.000 rpm y temperatura ambiente. Lavar el precipitado con etanol al 70%, dejar secar y resuspender en 1 ml de TE 1X (USB; Cleveland, EE.UU).

¹ **Solución GTE:** Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8; EDTA 10 mM pH 8.

² **Solución alcalina/SDS:** NaOH 0,2 N; SDS 1%.

³ **Solución de acetato potásico pH 4.8:** Se mezclan 60 ml de acetato potásico, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua destilada. La concentración final del potasio es 3 M y del acetato 5 M.

7.2.4.2 Minipreparaciones (minipreps).

Método de extracción rápido empleado para el análisis de un alto número de muestras (Holmes y Quigley, 1981). Mediante este protocolo se obtiene muy poca cantidad de ADN plasmídico.

- ⊙ Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular 1 ml de medio TB con el antibiótico adecuado. Incubar a 37°C y 250 rpm durante un mínimo de 6 h.
- ⊙ Recoger las células por centrifugación a 5.000 rpm durante 2 minutos. Resuspender el precipitado en 350 µl de STET¹ y añadir 13 µl de solución de lisozima (20 mg/ml en agua).
- ⊙ Resuspender agitando en vórtex y hervir durante 45 seg. Las proteínas y el DNA cromosómico se precipitan por centrifugación a 13.200 rpm durante 15 min.
- ⊙ Eliminar el precipitado obtenido (restos celulares y DNA cromosómico) con un palillo estéril y precipitar el resto con 1/10 acetato sódico 3M pH 5.2 y 1 volumen de isopropanol (aprox. 45 µl AcNa y 450 µl isopropanol). Mezclar y mantener a temperatura ambiente durante 5-10 min.
- ⊙ Centrifugar a 13.200 rpm durante 10 min. Lavar el precipitado resultante con 200 µl de etanol al 70%. Dejar secar el precipitado y resuspender en 30 µl de TE.

¹ **STET:** Sacarosa 8%, Tritón X-100 0,5%, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 50 mM.

7.2.4.3 GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare).

Se empleó este kit comercial cuando se quería secuenciar un plásmido debido a la alta pureza de la muestra obtenida.

7.2.5 Tratamiento con ribonucleasa A (ARNasa A).

Los métodos de extracción de ADN conllevan una contaminación de las muestras con ARN. Para eliminar dicho ARN se hizo un tratamiento con ribonucleasa A (ARNasa A)¹. Este tratamiento consistió en incubar la muestra con una concentración final de 100 µg/ml de enzima a 37°C durante 30 min (cuando se extrae ADN genómico, la concentración de ARNasa se puede incrementar y el tiempo de incubación puede aumentar hasta las 2 h). Finalmente la muestra se fenolizó y se precipitó.

¹ **Stock de ARNasa:** se disuelve en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y NaCl 15 mM a 10 mg/ml de concentración. Se calienta a 100°C durante 15 min para eliminar posibles ADNasas presentes, se deja enfriar lentamente, se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C.

7.2.6 Electroforesis en geles de agarosa.

Para la visualización y separación de fragmentos de ADN se emplea una técnica de electroforesis basada en la migración diferencial, a través de un gel de agarosa, de las diferentes moléculas de ADN cuando se aplica un determinado campo eléctrico (debido a los grupos fosfato presentes, las moléculas de ADN tienen carga negativa desplazándose, por tanto, hacia el polo positivo) (Maniatis *et al.*, 1982). El comportamiento de dichas moléculas a lo largo del gel viene definido por su configuración electroforética, que va a depender de su carga, su peso molecular y su conformación tridimensional. La migración de estas moléculas es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, de modo que las moléculas más pequeñas se desplazarán más a lo largo del gel que las grandes. También es importante la conformación de las moléculas, así las moléculas lineales ofrecerán más resistencia a la migración que las que se encuentren en forma circular covalentemente cerrada. La concentración de agarosa en el gel determina la porosidad del mismo, y va a venir marcada por el rango de tamaños de las moléculas de ADN a separar (Sambrook y Russell, 2001) (Tabla 1).

Concentración de agarosa (%)	Tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Kb)
0,5	1 - 20
0,7	0,8 - 12
1	0,5 - 10
1,5	0,2 - 3
2	0,05 - 2

Tabla 1. Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles relacionadas con el rango de tamaños de fragmentos de ADN a separar.

La velocidad de migración a lo largo del gel depende principalmente del voltaje aplicado y de la porosidad del gel. No se puede aumentar el voltaje indiscriminadamente ya que se produciría un exceso de calor que dañaría tanto el gel como el ADN, pero tampoco se puede utilizar un voltaje muy bajo ya que se produciría una separación muy pobre de los fragmentos de ADN debido a la difusión de los mismos a través del gel.

Se siguieron los protocolos descritos por Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook y Russell, 2001:

- ⊙ Disolver la agarosa (Bio Rad; Hércules, CA, EE.UU.) en tampón TAE¹ 1X y verterla en el molde adecuado. Dejar solidificar. Antes de quitar el peine, para facilitar su extracción, poner el gel a 4°C unos minutos.
- ⊙ Mezclar las muestras de ADN con 1/10 del volumen final de tampón de carga² concentrado (6X). Calentar la mezcla a 65°C en un baño de agua durante 10 min y enfriar en hielo antes de cargar las muestras en el gel.
- ⊙ Desarrollar la electroforesis horizontal en tampón TAE 1X aplicando un voltaje de entre 50 y 80 V.
- ⊙ Teñir el ADN mediante la inmersión del gel en una solución de bromuro de etidio³ durante 15-30 min. Los geles se visualizan sobre un transiluminador Macrovue V-25 (Hoefer) y se fotografían con el aparato Gel Doc 1000 (Bio Rad; Hércules, CA, EE.UU.).

¹ **TAE 50X:** 242 g Tris base (2 M); 57,1 ml ácido acético glacial (5,7% (v/v)); 100 ml EDTA 0.5 M pH 8 (50 mM); agua destilada hasta 1 L.

² **Tampón de carga (6X):** azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilene-cianol 0,25% (p/v); glicerol 50% (v/v); EDTA 0,1 M; SDS 0,1%; Tris-HCl 10 mM; en solución acuosa. Se conserva a 4°C.

³ **Bromuro de etidio:** Solución concentrada a 10 mg/ml en agua. Se conserva a 4°C protegida de la luz. Para un litro de agua destilada se añaden 50 µl de la solución concentrada. El bromuro de etidio es un agente intercalante que se introduce entre las dos hebras del ADN o las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos de cadena simple, permitiendo su visualización al iluminarlo con luz UV.

7.2.6.1 Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Para la purificación (aislamiento) de fragmentos amplificados de ADN a partir de una reacción de PCR o fragmentos purificados a partir de una digestión de ADN plasmídico, las muestras se separaron en un gel de agarosa y se utilizaron los kits comerciales GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) o Ultraclean® Microbial DNA Isolation kit (MoBio, Carlsbad, CA, EE.UU.) para su purificación, siguiendo las instrucciones del proveedor.

7.2.7 Digestión del ADN con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción son endonucleasas que catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster internos en las dos hebras del ADN bicatenario, generalmente en sitios específicos para

cada una de ellas (secuencias palindrómicas) llamados sitios de corte o restricción. Las condiciones óptimas para la digestión (temperatura, pH, concentración salina o presencia de cofactores) son específicas de cada tipo de enzima. Tanto el pH como la concentración salina y los suplementos necesarios son suministrados en los tampones de digestión.

Las enzimas de restricción fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Se siguieron las siguientes indicaciones generales:

- El volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de digestión debido a la alta concentración en glicerol de las soluciones de almacenamiento, concentraciones que podrían inhibir su propia actividad o favorecer la actividad STAR de la enzima (cortes inespecíficos).
- El ADN ha de estar lo suficientemente limpio con el fin de no alterar las condiciones de reacción. Si el ADN está resuspendido en TE, es importante que el volumen de ADN a digerir sea inferior a 1/10 del volumen total de reacción para que el TE no modifique las características del tampón de reacción.

A continuación se muestra el esquema seguido en la preparación de una reacción de digestión:

Tampón de digestión (10X)	1/10 del volumen final
ARNasa A (1mg/ml)	1/10 del volumen final
ADN	X ¹ µg
Enzima de restricción	1-2 U/µg ADN
Agua MilliQ	Hasta completar el volumen final

¹ Para digestiones analíticas, 1-2 µg ADN por 20 µl de volumen total de reacción (al digerir ADN plasmídico de miniprep, esta cantidad suele corresponder con 3 µl de la solución de ADN).

- Incubar a la temperatura adecuada para cada enzima durante 1-6 h.
- Analizar mediante electroforesis o fenolizar y precipitar, según su finalidad.

7.2.8 Reacciones modificadoras del ADN.

Para la utilización de las enzimas que se citan a continuación, se siguieron las instrucciones del proveedor.

7.2.8.1 Desfosforilación de extremos 5' de moléculas de ADN.

La fosfatasa alcalina es una enzima que hidroliza los extremos 5' fosfato de las moléculas de ADN, impidiendo que se forme un enlace fosfodiéster entre ambos extremos de la molécula. Este tratamiento se empleó para evitar la religación de un vector de clonación digerido con una enzima de restricción. La enzima utilizada fue aislada de intestino de ternera (*Calf Intestine Phosphatase Alkaline*; CIAP; Fermentas).

- ⊗ Disolver el ADN (vector linearizado) en 44 μl de agua MilliQ.
- ⊗ Añadir 5 μl del tampón de la fosfatasa¹ (10X) y 1 μl de la enzima CIAP (1 U/ μl).
- ⊗ Incubar a 37°C durante 30 min.
- ⊗ Fenolizar para eliminar los restos de enzima y precipitar.

¹ **Tampón de la fosfatasa (10X):** Tris-HCl 0,1 M pH7.5; 0,1 M MgCl₂.

7.2.8.2 Fosforilación de extremos 3' de moléculas de ADN.

La polinucleótido kinasa (PNK) del fago T4 es una enzima que añade grupos fosfato a los extremos 5'-hidroxilo de moléculas de ADN con gasto de ATP. Este tratamiento se aplicó a fragmentos de ADN amplificados por PCR destinados a ser insertados en un vector.

- ⊗ Disolver el inserto de ADN en 15 μl de agua MilliQ.
- ⊗ Añadir 2 μl del tampón de la enzima¹ (10X), 2 μl dATP (10 mM) y 1 μl de PNK (10 U/ μl).
- ⊗ Incubar a 37°C durante 30 min.
- ⊗ Fenolizar para eliminar los restos de enzima y precipitar.

¹ **Tampón de la polinucleótido kinasa (10X):** 500 mM Tris-HCl pH7.6; 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 1 mM espermidina; 1mM EDTA.

7.2.8.3 Rellenado de extremos cohesivos 5' de moléculas de ADN.

La enzima klenow es en realidad un fragmento de la ADN polimerasa I de *E. coli*, que mantiene las actividades exonucleasa 3'----5' y polimerasa 5'----3', utilizando esta última actividad para rellenar extremos cohesivos 5' de moléculas de ADN y convertirlos en extremos romos.

- ⊗ Disolver el inserto de ADN en 30 μl de agua MilliQ.
- ⊗ Añadir 4 μl del tampón de la enzima¹ (10X), 5 μl dNTPs (2mM) y 1 μl del fragmento klenow (10 U/ μl).
- ⊗ Incubar a 37°C durante 30 min.
- ⊗ Fenolizar para eliminar los restos de enzima y precipitar.

¹ **Tampón klenow (10X):** 500 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM MgCl₂; 10 mM DTT.

7.2.8.4 Adición de adeninas en el extremo 3' de fragmentos de ADN.

Cuando se obtuvieron genes mediante PCR para su posterior expresión en un vector, en la reacción se utilizó la *Pfu* ADN polimerasa, enzima de alta eficiencia pero que deja extremos romos.

Esto supuso un problema a la hora de clonar dicho fragmento en vectores comerciales que dejan una timina protuberante en el extremo 3'. Para añadir adeninas en los extremos 3' del fragmento a clonar se aplicó el siguiente tratamiento: al fragmento purificado se le añadieron 0,75 µl de *Taq* ADN polimerasa y se incubó a 72°C durante 10 min.

7.2.8.5 Ligación de moléculas de ADN.

La ADN ligasa del fago T4 es una enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato de ADN de doble cadena, requiriendo ATP e iones Mg^{2+} como cofactores.

El esquema para preparar una reacción de ligación fue el siguiente:

Vector linearizado	2 µl
Inserto	X ¹ µl
Tampón de la ligasa ² (10X)	3 µl
Ligasa (1 U/µl)	3 µl
Agua Milli Q	hasta 30 µl

¹ La relación vector/inserto varía, dependiendo de si se trata de ligaciones entre extremos romos o cohesivos, entre 1:3 y 1:1.

² **Tampón de la ligasa (10X):** Tris-HCl 0,4 M; MgCl₂ 0,1 M; DTT 0,1 M; dATP 5 mM; pH 7,8.

- Incubar en un baño de agua entre 4 y 16°C durante unas 12 h.

7.2.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Técnica desarrollada en 1987 por Kary Mullis (Mullis y Faloona, 1987) que nos permite amplificar selectivamente un segmento específico de ADN, hasta obtener una cantidad suficiente para su posterior análisis o manipulación. Se ha convertido en una técnica básica en biología molecular debido a su sencillez, rapidez y bajo coste.

Los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción son:

- Los 4 **desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTP)**, sustratos para polimerizar nuevo ADN.
- Dos **cebadores** u **oligonucleótidos** (en inglés, *primers*) que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas de nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia. Delimitan la zona

de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.

- **Iones divalentes.** Se suele emplear magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. Actúan como cofactores de la polimerasa.
- Una **solución tampón** que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- **ADN polimerasa termoestable** o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la polimerasa *Taq*).
- **ADN molde**, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.

El proceso de PCR consiste en la repetición (25-35 veces) de un ciclo compuesto por 3 etapas diferentes (desnaturalización, anillamiento y extensión), precedido todo ello por una desnaturalización inicial y seguido de una extensión final.

- **Desnaturalización inicial:** consiste en elevar la temperatura a 94-96°C durante varios minutos (2-3 min). Es necesaria para la activación de la ADN polimerasa y para asegurar que la desnaturalización del ADN sea completa.
- **Desnaturalización:** separación de las 2 hebras del ADN molde al elevar la temperatura (94-96°C).
- **Anillamiento:** unión de los oligonucleótidos a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos, permitiendo así el alineamiento. Esta temperatura depende básicamente de la longitud y % G+C de los cebadores.
- **Extensión:** paso en el cual actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5'→ 3'. La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la *Taq* polimerasa, la temperatura de máxima actividad está cercana a 72°C. El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar (*Taq* polimerasa: 2Kb/min).
- **Extensión final:** fase en la que se mantiene una temperatura constante de 70-74°C durante 10 min para asegurar que la ADN polimerasa complete todas las hebras de ADN amplificadas.

Los tiempos y temperaturas de cada fase son determinados empíricamente y vienen definidos por factores como el %G+C del ADN molde o de los oligonucleótidos, la longitud del fragmento a amplificar y la enzima utilizada. Un modelo genérico del proceso se indica en la Tabla 2.

Fase		Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial		94-96	2-3 min	1
Amplificación	Desnaturalización	94-96	30-60 s	25-35
	Anillamiento	3-5°C menor que la T _m de los cebadores	30-45 s	
	Extensión	70-74	1-2 Kb/min	
Extensión final		70-74	10 min	1

Tabla 2. Temperaturas y tiempos de reacción generales para una reacción de PCR.

A lo largo de este trabajo se emplearon 2 ADN polimerasas diferentes: para la amplificación rutinaria de secuencias en la que la fidelidad de amplificación no era crucial se empleó la *Taq* polimerasa, pero para la amplificación de fragmentos en la que la fidelidad de secuencia era esencial, como al amplificar ADN para la expresión de genes, se utilizó la *Pfu* polimerasa.

Siguiendo las instrucciones del proveedor (Fermentas, Vilnius, Lituania), el esquema para la preparación de las reacciones de PCR (25 µl volumen final) fue el siguiente:

Tampón 10X ¹	2,5 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,75 µl
Oligonucleótidos	0,1 - 1 µM
ADN molde	
- ADN plasmídico	0,01 – 0,5 ng
- ADN genómico	0,05 – 0,5 ng
ADN polimerasa	0,25 µl
Agua MilliQ	hasta 25 µl

¹ En el caso de la *Pfu* polimerasa, el tampón contiene 20 mM MgSO₄ por lo que no hay que añadir MgCl₂.

Una vez llevadas a cabo, las reacciones fueron analizadas en geles de agarosa para comprobar la cantidad de fragmento amplificado y la ausencia de amplificaciones inespecíficas.

7.2.9.1 Terra™ PCR Direct Polymerase Mix (Clontech, CA, EE.UU.).

Cuando se quisieron analizar mediante PCR un número de muestras muy elevado, estudio en el que el tiempo necesario para el aislamiento de cada uno de los ADNs sería muy limitante, se utilizó este kit comercial. Está diseñado para la amplificación de fragmentos de ADN directamente de muestras de tejido y puede actuar sobre muestras poco purificadas y con muy poca cantidad de ADN.

Preparación de la muestra: se tomó un disco de 2 mm de diámetro de micelio del hongo crecido en medio sólido, se le añadieron 180 µl de 50 mM NaOH y se incubó 10 min a 95°C. Luego se neutralizó con 20 µl de Tris-HCl 1M pH 8 y se guardó a 4°C hasta su uso (hasta 1 mes).

Buffer 2X ¹	12,5 µl
Cebador 1	0,3 µM
Cebador 2	0,3 µM
Muestra	5 µl
Terra PCR Polymerase Mix	0,5 µl
Agua MilliQ	hasta 25 µl

¹ **Buffer 2X:** contiene dNTPs y Mg²⁺. La concentración final de estos 2 compuestos en la mezcla de reacción es de 400 µM para los dNTPs y de 2 mM para el ión Mg²⁺.

Dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar, el termociclador se programó como se indica en la tabla 3.

Fragmentos < 2 Kb			Fragmentos ≥ 2 Kb		
98°C	2 min	40 ciclos	98°C	2 min	40 ciclos
98°C	10 s		98°C	10 s	
60°C	15 s		68°C	1 Kb/min	
68°C	1 Kb/min				

Tabla 3. Temperaturas y tiempos de reacción aplicados en una reacción de PCR empleando el kit Terra™ PCR Direct Polymerase Mix, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar.

7.2.10 Hibridación de ADN en membrana.

La transferencia a un soporte sólido (membrana) de fragmentos de ADN obtenidos mediante la digestión con enzimas de restricción y su posterior resolución en un gel de agarosa se denomina *Southern blotting* (Southern, 1975). Es una técnica muy utilizada en biología molecular para la detección de un determinado segmento de ADN, como por ejemplo la detección de un gen concreto.

Una vez transferido, el ADN es hibridado con una sonda (fragmento de ADN complementario a la secuencia que se quiere detectar) marcada de forma no radiactiva con digoxigenina (DIG).

7.2.10.1 Transferencia por capilaridad.

Una vez digerido completamente el ADN con endonucleasas y sometido a electroforesis en gel de agarosa (normalmente del 0,8%), se llevó a cabo la transferencia del ADN del gel a la membrana.

- ⊙ Tratar el gel con HCl 0,25 N durante 15 minutos en agitación moderada (se observa que los colorantes del tampón de carga cambian de color). A continuación, el gel se lava con agua destilada.
- ⊙ Sumergir el gel durante 45 minutos en la solución de desnaturalización¹ (se observa la vuelta al color original de los colorantes), también en agitación moderada. Lavar posteriormente con agua destilada.
- ⊙ Sumergir el gel en la solución de neutralización² durante 45 minutos, también en agitación.
- ⊙ Finalmente, pasar el gel a solución 20XSSC³ mientras se prepara la “torre de transferencia” (Fig.12). La transferencia se llevó a cabo por capilaridad desde el gel a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche; Basilea, Suiza). En todo momento se evitó la formación de burbujas de aire entre las diferentes partes de la torre. Mantener la transferencia por capilaridad así dispuesta al menos durante 12 horas.

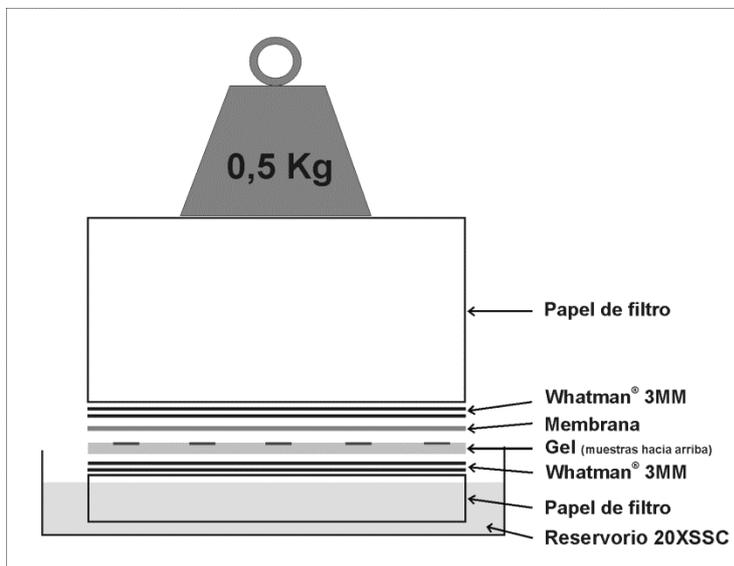


Figura 12. Torre de transferencia.

- ⊙ Tras la transferencia, lavar la membrana en 6XSSC durante 5 minutos. Dejar secar al aire e irradiar con luz UV en un *Stratalinker* (Stratagene; La Jolla, EE.UU.) aplicando 2 pulsos de 120 mJ cada uno para fijar los ácidos nucleicos a la misma.

¹ Solución de desnaturalización: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M.

² Solución de neutralización: NaCl 3 M; Tris HCl 1 M pH 7,5.

³ 20XSSC: NaCl 3 M; Citrato sódico 0,3 M. Se ajusta a pH 7,0 con NaOH.

7.2.10.2 Marcaje de la sonda.

La sonda, una vez diseñada, se obtuvo mediante PCR o por digestión con enzimas de restricción y se purificó de gel.

Se utilizó el kit comercial DIG DNA Labeling Kit (Roche; Basilea, Suiza) para marcar las sondas de forma no radiactiva con digoxigenina (DIG). Este sistema se basa en la hibridación al azar de oligonucleótidos al ADN desnaturalizado. La hebra complementaria es sintetizada por la enzima Klenow que utiliza el extremo 3'-OH libre de los oligonucleótidos como *primers* y una mezcla de desoxirribonucleótidos (con DIG-11-dUTP) para la elongación. La DIG incorporada en los fragmentos de ADN proporciona una gran sensibilidad en la inmunodetección por anticuerpos anti-DIG conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. Se utilizó el protocolo proporcionado por el proveedor.

- ⊕ Resuspender la sonda a marcar en 15 µl de agua MilliQ.
- ⊕ Preparar en un microtubo la reacción de marcaje con: los 15 µl de sonda, 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos 10X, 2 µl de una mezcla de dNTPs 10X (1mM dATP; 1 mM dCTP; 1 mM dGTP; 0.65 mM dTTP; 0.35 mM DIG-11-dUTP) marcados y 1 µl de la enzima Klenow. Incubar a 37 °C durante 1 - 20 horas.
- ⊕ Añadir 2 µl de EDTA 0,2M para parar la reacción, 2,5 µl de LiCl 4M y 75 µl de etanol absoluto frío para precipitar la sonda. Mantener a -20°C al menos 2 h.
- ⊕ Centrifugar 30 min a 13.200 rpm y 4°C, lavar con etanol al 70% (previamente enfriado a 4°C) y resuspender en 50 µl de TE 1X (USB; Cleveland, EE.UU.).
- ⊕ Incubar a 37°C durante 30 min y guardar a -20°C hasta su uso.

7.2.10.3 Hibridación del ADN.

En esta fase la sonda marcada va a unirse específicamente a su secuencia complementaria en la membrana de nylon, permitiendo así su posterior detección. Consta de 2 pasos:

- **Prehibridación:** tiene como finalidad el bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido ácidos nucleicos durante la transferencia y equilibrar ésta con el tampón de hibridación.

Consistió en la incubación de la membrana (dentro de una bolsa de hibridación) con el tampón de hibridación¹ en un baño de agua a 42°C con agitación moderada durante 3-6 h. El volumen del tampón añadido no debe superar los 100 µl por cm² de membrana.

¹ **Tampón de hibridación Southern con formamida al 50%:** Para preparar 200 ml, se añaden en este orden 7,8 ml de agua destilada, 50 ml 20XSSC, 40 ml de solución de bloqueo² 10X, 0,4 ml de SDS al 10% y 2 ml de lauroilsarcosina al 10%. En último lugar se añaden 100 mL de formamida. Almacenar a -20°C. Para otras concentraciones de formamida, variar simplemente la cantidad de agua y de formamida.

² **Solución de bloqueo 10X:** 10 g *blocking reagent* (Roche; Basilea, Suiza) en 100 ml tampón maleico³.

³ **Tampón maleico:** NaCl 100 mM; ácido maleico 150 mM, pH 7,5.

- **Hibridación:** en ella se lleva a cabo la unión de la sonda con el ADN fijado a la membrana. Su especificidad depende tanto de las condiciones empleadas durante la incubación (temperatura de incubación o la concentración de formamida, sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de los lavados posteriores.

La hibridación se llevó a cabo en agitación a 42°C durante al menos 12 horas en el tampón de hibridación, al que se le añadió la sonda marcada desnaturalizada (se calentó durante 10 minutos a 100°C y posteriormente se pasó a hielo durante al menos 2 minutos).

7.2.10.4 *Inmunodetección de la sonda marcada con DIG.*

La detección se realizó con anticuerpos frente a DIG conjugados con fosfatasa alcalina. El revelado de la actividad fosfatasa se llevó a cabo mediante una reacción quimioluminiscente, para lo que se empleó el protocolo recomendado por la casa comercial (Roche; Basilea, Suiza), con algunas pequeñas modificaciones.

Previo a la detección, se llevaron a cabo varios lavados de la membrana para eliminar las uniones inespecíficas entre la sonda y el ADN. Esto se consigue: I) disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado; II) aumentando la concentración de detergentes en dicho tampón y III) aumentando la temperatura y tiempo de los lavados.

- ⊙ Filtrar el tampón de hibridación con la sonda a través de nylal y guardarlo a -20°C para posteriores usos.
- ⊙ Hacer dos lavados de la membrana en 2XSSC + 0,1% SDS durante 5 min cada uno, a temperatura ambiente y en agitación moderada.
- ⊙ Hacer otros dos lavados en 0,5XSSC + 0,1% SDS durante 15 min cada uno, a 68°C en agitación moderada.
- ⊙ Tratar la membrana con tampón de lavado¹ durante 5 min en agitación a temperatura ambiente.
- ⊙ Incubar con solución de bloqueo 1X² en agitación a temperatura ambiente durante 30 min.
- ⊙ Tratar con solución del conjugado³ en agitación a temperatura ambiente durante 30 min.
- ⊙ Hacer dos lavados de 15 min cada uno en tampón de lavado en agitación.
- ⊙ Tratar con tampón de detección⁴ durante 5 min en agitación.
- ⊙ Incubar en solución CDP⁵ durante 5 min en oscuridad y agitación.
- ⊙ Envolver la membrana en film transparente y exponer con una película radiográfica (Hyperfilm™, GE Healthcare, UK) durante el tiempo necesario para la detección (15 min – 1 h).

⊙ Revelar en oscuridad: sumergir la película fotográfica en revelador⁶ hasta que se vean las bandas (con cuidado de que no se oscurezca demasiado el fondo), luego en solución de paro⁷ durante 1 min y finalmente en fijador⁸ hasta que el fondo de la película se vea totalmente transparente. Lavar con agua y dejar secar.

¹ **Tampón de lavado:** Tween 20 al 0,3% en tampón maleico.

² **Solución de bloqueo 1X:** 10 ml solución de bloqueo 10X + 90 ml de tampón maleico.

³ **Solución del conjugado:** 5 µl del conjugado (anticuerpos anti-DIG; Roche, Basilea, Suiza)(dilución 1:1000) en 100 ml de solución de bloqueo 1X.

⁴ **Tampón de detección:** Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM.

⁵ **Solución CDP:** diluir 1:1000 el reactivo CDP-Star (Roche, Basilea, Suiza) en tampón de detección.

⁶ **Revelador:** diluir el preparado comercial HC-110 (Kodak) 1:31 en agua.

⁷ **Solución de paro:** 3% (v/v) ácido acético en agua.

⁸ **Fijador:** diluir el preparado comercial de Tetenal 1:9 en agua.

7.2.11 Secuenciación del ADN.

Los clones seleccionados se secuenciaron mediante el método de secuenciación de Sanger (Sanger, 1977), utilizando un secuenciador automático MegaBACE 500 (Amersham Biosciences), en el servicio de análisis de ácidos nucleicos de la Universidad de León.

La secuenciación, según el método de Sanger, se basa en la utilización de didesoxinucleótidos (nucleótidos que han perdido el grupo hidroxilo en la posición 3' lo que impide que la ADN polimerasa elongue la cadena de nucleótidos a partir de ellos). Se prepara una mezcla del ADN molde de secuencia desconocida con el/los cebador/es adecuados, los 4 nucleótidos, la ADN polimerasa y los 4 didesoxinucleótidos marcados cada uno con un fluoróforo diferente (si no se utilizara un secuenciador automático, habría que preparar 4 reacciones diferentes, una para cada didesoxinucleótido). Así se obtiene una mezcla de hebras de ADN que difieren en la longitud de un par de bases, teniendo en su extremo un didesoxinucleótido marcado. Se hace una electroforesis capilar con el conjunto de hebras de modo que las hebras más pequeñas migren más rápido que las más grandes. Al final del capilar hay un detector fluorescente que excita el fluoróforo de cada hebra que pasa por él, diferenciando unos de otros en función de la longitud de onda emitida. Un sistema informático acoplado al secuenciador procesa los datos y genera un electroferograma con la secuencia de nucleótidos.

7.2.12 Software empleado en el análisis del ADN.

- **BioEdit:** utilizado en el análisis de electroferogramas de secuenciación, para limpiar y corregir la secuencia.
- **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tools*): en la búsqueda de secuencias similares a las obtenidas por secuenciación se utilizó esta combinación de programas informáticos que

permiten diferentes acciones sobre secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Lleva a cabo alineamientos de tipo local entre una secuencia problema y una base de datos. Es una herramienta rápida y fiable que tiene la ventaja de aportar una evaluación estadística de los resultados: el parámetro *E-value* indica la probabilidad de que el alineamiento de secuencias haya ocurrido al azar, entonces, cuanto menor sea este número, más fiable es el resultado. Las comparaciones de secuencias utilizando los diferentes algoritmos BLAST (BlastN, BlastX, BlastP) se llevaron a cabo en la página web del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990).

- **CLC Protein Workbench 5.4 (CLC bio) y Jalview 2.6.1:** fueron utilizados para comparar múltiples secuencias de aminoácidos (método Clustal) y para emparejar alineamientos de proteínas de la misma familia (método Lipman-Pearson) (Waterhouse *et al.*, 2009). Proporcionan información sobre la evolución de esa familia de proteínas, ya que el alineamiento muestra la presión de la evolución en cada aminoácido y las posiciones que son clave para mantener el plegamiento y la función de esas proteínas.
- **DNASTar (Lasergene):** software formado por varios subprogramas:
 - EditSeq: permite la edición de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, la búsqueda de marcos de lectura abierta (*Open Reading Frames*, ORFs) y la traducción de los mismos a secuencia proteica.
 - MapDraw: permite la elaboración de mapas de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, incluyendo sitios de restricción para endonucleasas, y la creación de etiquetas para la diferenciación de las distintas partes de la secuencia.
 - Primer select: programa que proporciona las características de los oligonucleótidos introducidos (longitud, %G+C, T_m, posibilidad de autoanillamiento y de anillamiento con el otro oligonucleótido que conforma la pareja).
 - SeqMan: permite el ensamblaje de secuencias parciales o cromatogramas de un mismo clon.
 - Protean: utilizado para el análisis de las características estructurales de las proteínas (empleando el algoritmo Hoop-Woods; Hoop y Woods, 1981).
- **MatInspector Profesional** (Quandt *et al.*, 1995): software utilizado en la búsqueda de dominios de unión de factores de transcripción presentes en una secuencia de ADN. Emplea la base de datos Transfac y está disponible en versión de acceso limitado en la página web <http://genomatix.de>.
- **MEGA 4:** empleado para determinar las distancias evolutivas entre los genes *tri* de diferentes hongos, utilizando un análisis de distancias pareadas.

7.3 Análisis y manipulación de ARN.

7.3.1 Obtención del ARN total de hongos filamentosos.

Se empleó una variante a pequeña escala del método descrito por Chomczynski y Sacchi, 1987.

- ⊙ Crecer el hongo como se indica en el apartado 6.1.1.3 durante 24-96 h.
- ⊙ Recoger el micelio por filtración a través de nital estéril y lavar con 1 volumen de NaCl 0,9%-DEPC¹. Secar el micelio todo lo posible presionándolo entre papeles de filtro.
- ⊙ Congelar el micelio inmediatamente en nitrógeno líquido sobre un mortero donde será reducido a un polvo muy fino.
- ⊙ Introducir el micelio machacado en un microtubo de 2,2 ml sin superar los 0,5 ml de volumen y añadir 0,5 ml de tampón de rotura², 0,5 ml de fenol-TLE⁴ y 0,5 ml cloroformo. Homogeneizar todo bien e incubar en un baño a 50°C durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos.
- ⊙ Centrifugar a 8000 rpm y 4°C durante 20 minutos. Recoger la fase acuosa y extraer con 0,5 volúmenes de fenol-TLE y 0,5 volúmenes de cloroformo hasta obtener una interfase limpia.
- ⊙ Extraer una última vez con 1 volumen de cloroformo para eliminar los restos de fenol y pasar la fase superior a un nuevo tubo.
- ⊙ Precipitación selectiva del ARN: añadir 1/3 del volumen total de LiCl 8M (teniendo así una concentración final de 2M de LiCl). Mantener a 4°C durante 10-12 horas.
- ⊙ Centrifugar a 8000 rpm y 4°C durante 30 minutos. Lavar el precipitado con 0,5 ml de LiCl 2M y resuspender en 600 µl agua-DEPC (calentando a 70°C durante 10 min si fuera necesario).
- ⊙ Precipitar nuevamente añadiendo 1/3 del volumen de LiCl 8M y mantener 2-4 horas a 4°C.
- ⊙ Centrifugar a 8000 rpm y 4°C durante 30 minutos, lavar el precipitado con 200 µl LiCl 2M y resuspender en 200 µl agua-DEPC.
- ⊙ Por último, precipitar con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 4,8 – DEPC y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Guardar a -80°C hasta su uso.

¹ **Tratamiento de soluciones con dietilpirocarbonato (DEPC):** es importante que todas las soluciones que se utilicen en el proceso de extracción de ARN (excepto las que lleven Tris-HCl) sean tratadas con DEPC con el fin de inactivar las ARNsas. Añadir un 0,2% de DEPC a la solución a tratar, mezclar durante 2-4 horas y esterilizar (proceso durante el cual el DEPC se degrada).

² **Tampón de rotura:** TLE³ + 1% de SDS (p/v).

³ **TLE:** Tri-HCl 0,2M; LiCl 0,1M; EDTA 4,5 mM pH 8. Ajustar el pH a 8,2 con HCl.

⁴ **Fenol equilibrado con TLE (Fenol-TLE):** mezclar 250 ml de fenol ácido, 250 ml de TLE y 0,5 ml NaOH 15M-DEPC. Mezclar y eliminar la fase acuosa. Extraer una vez más con TLE, eliminar la fase acuosa y conservar a 4°C en un recipiente opaco.

7.3.2 Tratamiento con desoxirribonucleasa I (ADNasa I).

Al extraer el ARN por el método anterior, la muestra queda contaminada con trazas de ADN genómico el cual es eliminado mediante un tratamiento con ADNasa I. Para ello se siguieron las instrucciones de la casa comercial Fermentas (Vilnius, Lituania).

- Ⓢ Resuspender el ARN en 88 μ l de agua –DEPC.
- Ⓢ Añadir 10 μ l del tampón de ADNasa 10X¹, 1 μ l de inhibidor de ARNasas y 1 μ l de la enzima (1 U/ μ l).
- Ⓢ Incubar a 37°C durante 30 min.
- Ⓢ Fenolizar y precipitar añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 4,8 – DEPC y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Guardar a -80°C hasta su uso.

¹ **Tampón ADNasa 10X:** 100 mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂.

7.3.3 Retrotranscripción del ARN (RT-PCR).

La amplificación por PCR del producto de retrotranscripción del ARNm permite llevar a cabo una amplia gama de análisis, tales como la detección de moléculas de ARN, el clonaje del ADNc de un mensajero, el análisis y la cuantificación de los transcritos, la construcción de bibliotecas de ADNc o la determinación de intrones.

El primer paso consiste en la síntesis de la primera hebra del ADNc mediante la acción de la transcriptasa inversa sobre el ARNm puro o mezcla de varios tipos de ARN. Los oligonucleótidos empleados pueden ser:

- Una mezcla de oligómeros (hexámeros) contruidos al azar (*random primers*). Se usa cuando lo que se quiere obtener es la síntesis indiscriminada del ADNc.
- Oligonucleótidos compuestos por timinas (normalmente 15, oligo dT₁₅) capaces de unirse a las colas de poli(A) de los mensajeros eucariotas. Se emplean para amplificar la secuencia completa de los ARNm con colas poli(A).
- Oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación específica de un determinado ARNm.

La segunda parte es una reacción de PCR que utiliza como molde el ADNc.

En este trabajo se realizó la síntesis del ADNc con tres finalidades diferentes: la expresión heteróloga de genes en levaduras, la delimitación de los intrones de los genes *tri* y el análisis de los transcritos mediante PCR a tiempo real, utilizándose para ello 2 kits comerciales diferentes que se describen a continuación.

7.3.3.1 Superscript III one-step RT-PCR with Platinum Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Kit empleado para la retrotranscripción completa de los ARNm de los genes de Ta37 que se expresaron en levaduras. Tanto la síntesis del ADNc como la posterior PCR se realizaron en un solo

paso. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, la reacción de RT-PCR se preparó en un tubo de PCR como se indica a continuación:

Tampón de reacción 2X	25 µl
ARN molde	500 ng
Cebador 1	1 µl
Cebador 2	1 µl
<i>Platinum Taq</i> polymerase mix	1 µl
Agua MilliQ	hasta 50 µl

Se programó el termociclador para que la reacción de síntesis del ADNc fuera seguida inmediatamente por la de PCR (Tabla 4).

		Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Síntesis ADNc	Síntesis	55	30 min	1
	Desactivación	94	2 min	1
PCR	Desnaturalización	94	15 s	
	Anillamiento	55	30 s	40
	Extensión	68	1 Kb/min	
	Extensión final	68	5 min	1

Tabla 4. Temperaturas y tiempos empleados en la reacción de RT-PCR.

El producto de la reacción fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y congelado a -20°C hasta su uso.

7.3.3.2 Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EE.UU.)

Utilizando este kit comercial se sintetizó la primera cadena de los ADNc destinados a estudios por la técnica de PCR a tiempo real.

Buffer de la reacción 10X	2 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
Inhibidor ARNasas	0,5 µl
AMV retrotranscriptasa	0,6 µl
Oligo d(T) ₁₅	1 µl
ARN molde ¹	1 µg
Agua-DEPC	hasta 20 µl

¹ **ARN molde:** antes de añadirlo al tubo de reacción, se calentó a 70°C durante 10 min para eliminar las estructuras secundarias.

Se programó el termociclador con las siguientes temperaturas: 42°C durante 15 min y 95°C durante 5 min para desactivar el enzima. El contenido del tubo se diluyó hasta los 80 µl con TE 1X (USB, Cleveland, EE.UU.) y se guardó a -20°C hasta su uso.

7.3.4 PCR a tiempo real (qPCR).

En los últimos años la técnica de qPCR se ha consolidado como una herramienta básica en los laboratorios de biología molecular a la hora de detectar y cuantificar transcritos, llegando incluso a desplazar en algunas aplicaciones a la técnica de *Northern blotting*.

En qPCR, la cantidad de ADN es medida después de cada ciclo con el uso de marcadores fluorescentes que son incorporados al producto de la PCR. El incremento de la señal fluorescente es directamente proporcional al número de moléculas de ADN generadas (amplicones) durante la fase exponencial de la reacción. El cambio en el nivel de fluorescencia a lo largo de la reacción es medido por un instrumento que combina la función de termociclador con la capacidad de escanear la señal fluorescente. Relacionando la fluorescencia con el número de ciclo, el aparato de qPCR genera un gráfico de amplificación que representa la acumulación del producto de PCR a lo largo de la reacción (Fig.13.A.). Esta capacidad de monitorizar la reacción durante su fase exponencial permite al investigador determinar la cantidad inicial de un transcrito específico con gran precisión.

Conceptos importantes en qPCR:

- **Ciclo umbral (Ct; *threshold cycle*):** es el número de ciclo al cual la señal fluorescente cruza el umbral de detección. Se utiliza para calcular la cantidad inicial de ADN ya que el Ct es inversamente proporcional a dicha cantidad.
- **Curva estándar:** generada por una serie de diluciones seriadas de un transcrito de concentración conocida. Se emplea para conocer la cantidad inicial de un transcrito o para determinar la eficiencia de la reacción.
- **Eficiencia (E):** está relacionada con la pendiente de la curva estándar mediante la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Idealmente, la eficiencia de una reacción de PCR ha de ser del 100% (pendiente de -3,32), lo que significa que el transcrito se duplica tras cada ciclo durante la fase exponencial de la amplificación. Una buena reacción ha de tener una eficiencia de entre el 90 y el 110%.

- **Curva de disociación (*melting curve*):** indica el cambio de fluorescencia observada cuando el ADN de doble cadena (con los marcadores fluorescentes incorporados) se disocia en ADN de cadena simple al ir aumentando la temperatura de la reacción (Fig.

13.B.). Cuando el ADN de doble cadena unido al marcador SYBR Green es calentado, se detecta una repentina disminución en la fluorescencia cuando se alcanza la temperatura de disociación (T_m), provocada por la disociación del ADN y la liberación del marcador. El análisis de esta curva tras la reacción es una forma simple y directa de detectar la presencia de dímeros de los cebadores y otras contaminaciones en la reacción de PCR, así como de determinar su especificidad.

- **Gen *housekeeping* o gen de referencia:** es un gen cuya expresión se mantiene constante a lo largo del experimento, lo que nos ayuda a comparar la expresión relativa de los genes entre varias muestras. La elección de un gen de referencia ha de ser validada en cada muestra para comprobar que su expresión permanece constante. Para hacer esta comprobación, en este trabajo se utilizó el software GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002).

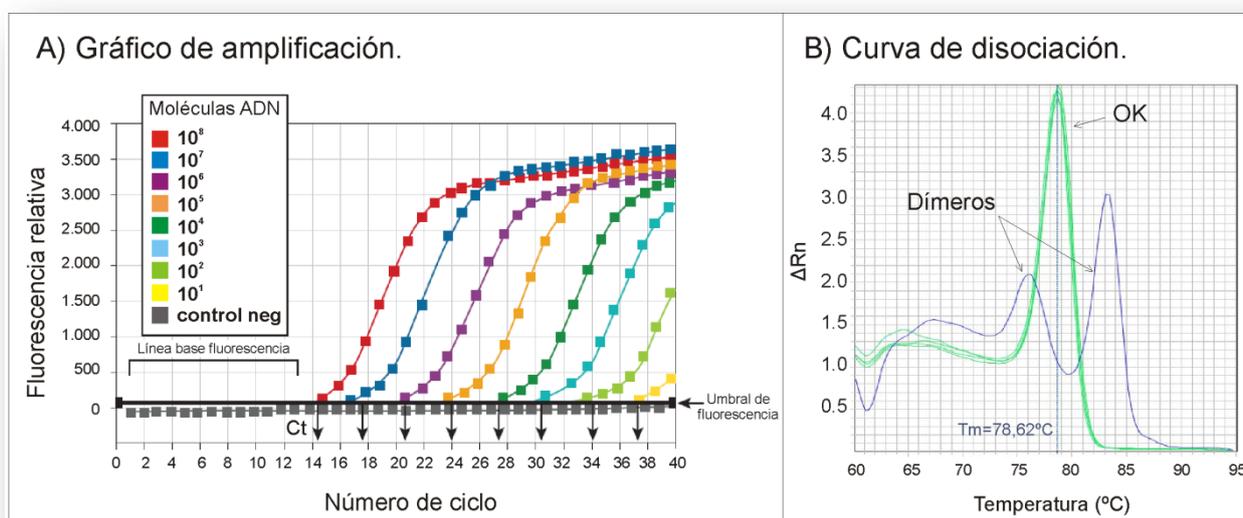


Fig. 13. Técnica de qPCR. A) Gráfico de amplificación en el que se representa la fluorescencia frente al número de ciclo. Se muestran la línea base y el umbral de fluorescencia, valores necesarios para establecer el valor de Ct. Se observa cómo al aumentar la cantidad de ADN molde, el Ct va disminuyendo (Modificada de Handbook for Real-Time PCR: from theory to practice, Invitrogen, 2008). **B)** Curva de disociación típica en la que se muestra una curva correspondiente a una reacción de PCR sin contaminaciones ni cebadores formando dímeros (líneas verdes) y otra en la que se aprecia la formación de dímeros (línea azul).

Diversas tecnologías de detección fluorescente pueden ser utilizadas en qPCR, y cada una tiene unos requerimientos específicos a la hora de diseñar el experimento. Todas están basadas en la generación de una señal fluorescente que es proporcional a la cantidad del producto de PCR formado. Los 3 sistemas de detección principales son:

- **Agentes de unión al ADN:** tecnologías SYBR Green y SYBR GreenER™. Son los más utilizados. El marcador emite fluorescencia al intercalarse en el ADN de doble cadena.

- **Cebadores fluorescentes:** cebadores fluorogénicos LUX™ y cebadores qPCR Amplifluor™.
- **Sondas fluorescentes:** TaqManR, Scorpions, Molecular Beacons.

En este trabajo se utilizaron 2 kits comerciales basados en la tecnología SYBR Green: Express SYBR® Green qPCR Supermix Universal (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.). Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, la reacción de qPCR se preparó como se indica a continuación:

Master Mix 2X	10 µl
ROX ¹	0,4 µl
Cebador 1 (10 µM)	0,4 µl
Cebador 2 (10 µM)	0,4 µl
ADNc molde	5 µl
Agua MilliQ	hasta 20 µl

¹ **ROX:** reactivo que actúa como referencia de fluorescencia interna. En el kit de Applied Biosystems viene incluido en el Master Mix por lo que el volumen de ROX se suple con agua.

Las reacciones se prepararon en placas microtiter de 96 pocillos y se analizaron en el aparato de qPCR Step One Plus System 2000, equipado con el software Step One™ v2.0 (Applied biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.), utilizando el siguiente programa (Tabla 5):

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Extensión	60	1 min	
Curva disociación	95	15 s	
	60	1 min	
	+0,3°C hasta los 95°C	15 s /temperatura	

Tabla 5. Temperaturas y tiempos utilizados en la reacción de qPCR.

Para cada par de oligonucleótidos, se llevó a cabo una curva estándar para el cálculo de la eficiencia de la reacción. En todos los casos, las reacciones se hicieron por triplicado. Los datos de Ct obtenidos fueron analizados mediante el programa REST2009® (Pfaffl *et al.*, 2002).

7.3.4.1 Software empleado en el análisis de datos de qPCR.

- **GeNorm**: programa empleado para seleccionar los mejores genes de referencia para cada cepa en experimentos de qPCR (Vadesompele *et al.*, 2002).
- **REST2009**[®] (Pfaffl *et al.*, 2002): software utilizado para analizar los datos de Ct obtenidos mediante qPCR. Este programa proporciona datos normalizados entre los diferentes genes objeto de estudio y el/los gen/es de referencia y compara esta expresión entre una muestra control y una muestra problema, generando un estudio estadístico sobre las diferencias observadas.

8 Utilización de genotecas de ADN en vectores fágicos.

8.1 Construcción de la genoteca de ADN genómico de Ta37.

Una genoteca es un conjunto de clones de un organismo huésped (fago lambda) en el que se ha introducido todo el genoma de un organismo de interés (Ta37) en forma de fragmentos clonados en un vector adecuado (vector fágico en este caso). En teoría, una genoteca o librería genómica debería representar el genoma completo en forma de un conjunto de fragmentos clonados parcialmente solapados.

8.1.1 Digestión del ADN genómico de la cepa Ta37.

El primer paso fue poner a punto las condiciones de digestión del ADN genómico de Ta37 para determinar la concentración óptima de la enzima para obtener fragmentos de ADN del tamaño deseado para construir una librería genómica (aproximadamente 16 Kb).

Para ello se preparó un lote específico de ADN genómico de Ta37. Una vez extraído, este ADN fue disuelto en un total de dos mililitros de TE 1X y se mantuvo a 65°C durante 15 minutos hasta su total disolución. Posteriormente se trató con 10 µl de ARNasa (sotck 10 mg/ml) durante 1,5 h a 37°C. El ADN genómico fue entonces sometido a un proceso de fenolización para su limpieza que consistió en una etapa de tratamiento con fenol, 4 pasos de tratamiento con fenol-CIA y 1 etapa con CIA, posteriormente fue precipitado con etanol y acetato sódico 3M pH 7 y mantenido a -20°C durante 6 h. El ADN fue concentrado en 500 µl de TE 1X, y 2 µl fueron digeridos parcialmente con diferentes concentraciones de *Sau3AI*, manteniendo las digestiones a 37°C durante 1 h (digestiones realizadas en un volumen de 50 µl). Las condiciones consideradas adecuadas fueron escaladas a un volumen de 2 ml con el fin de obtener suficiente DNA para cargar un gradiente de sacarosa.

8.1.2. Fraccionamiento del ADN genómico en gradientes de sacarosa y ligación de las fracciones seleccionadas con el vector fágico λ DASHII.

El método usado fue el descrito por Ausubel *et al.* (1987), y se utilizó para fraccionar digestiones parciales del ADN total de la cepa Ta37.

- ⊙ Preparar 10 ml de un gradiente lineal de sacarosa desde el 10% al 40%¹ en un tubo de centrifuga Ultra Clear™ (14 x 89 mm, Beckman Instruments) y dejar reposar horizontalmente durante 4 h.
- ⊙ Calentar el ADN genómico de Ta37 (digerido parcialmente) durante 5 min a 65°C antes de cargarlo en el gradiente.
- ⊙ Cargar cuidadosamente el ADN en la parte superior del gradiente y centrifugar a 35.000 rpm y 22°C durante 16 h.
- ⊙ Fraccionar el gradiente con la ayuda de una bomba peristáltica mediante la introducción de un capilar en el fondo del tubo de centrifuga, recogiendo aproximadamente 500 μ l por fracción.
- ⊙ Mezclar 10 μ l de cada fracción con 40 μ l de H₂O y 5 μ l de tampón de carga concentrado seis veces (6x)². Calentar las muestras durante 5 min a 65°C y analizar en un gel de agarosa del 0.3%.
- ⊙ Una vez seleccionadas las fracciones útiles, diluir cada una de ellas con TE hasta llevar la sacarosa a una concentración aproximada del 10% y precipitar el ADN con 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol frío.
- ⊙ Recuperar el ADN de las fracciones seleccionadas por centrifugación, lavar el precipitado con etanol al 70%, secar al aire durante 5 minutos y resuspender el DNA en un volumen total de 10 ml de H₂O destilada estéril.
- ⊙ Utilizar 2,5 ml de ADN para ligar con los brazos del vector λ DASHII³ (Stratagene, La Jolla, CA).

¹ **Solución de sacarosa 10% / sacarosa 40%:** NaCl 1 M; Tris-HCl 20 mM pH 8; EDTA 5 mM; sacarosa al 10%/40%.

² **Tampón de carga 6X:** Azul de bromofenol 0,25%; Xilene cianol 0,25%; sacarosa 40%. Conservar a 4°C.

³ **Brazos del vector λ DASHII,** comercializados ya digeridos con *Bam*HI, *Eco*RI y desfosforilados para evitar autoligaciones y maximizar la ligación con los fragmentos del DNA genómico.

8.1.3. Encapsidación “*in vitro*” del ADN del fago λ DASHII y derivados.

El empaquetamiento o encapsidación “*in vitro*” es el método más eficiente para la amplificación y mantenimiento en *E. coli* de ADNs recombinantes clonados en los vectores de sustitución derivados del fago lambda. Este procedimiento, desarrollado en 1977 (Hohn y Murray, 1977), presenta una serie de ventajas:

- Obtención de eficiencias de empaquetamiento de hasta 10⁹ unidades formadoras de placa (ufp) por μ g de ADN.

- La genoteca encapsidada es estable durante largos periodos de tiempo, pudiéndose conservar en SM más 1% de cloroformo a 4°C o bien a -80°C añadiendo un 7% de DMSO.

Para que ocurra el empaquetamiento "*in vitro*" se deben cumplir varios requisitos:

- La longitud de cada monómero formado debe estar entre 38,5 y 52 kb, lo cual supone entre el 78% y el 107% de la longitud del fago lambda silvestre.
- Cada unidad monomérica debe tener un sitio cos en cada extremo.
- El DNA debe estar en una conformación física correcta: multímeros lineales (concatémeros) y multímeros circulares son adecuados para el empaquetamiento, mientras que los monómeros circulares son empaquetados muy pobremente.

El ADN recombinante en una de las formas correctas anteriormente indicadas fue empaquetado en extractos fágicos, para lo que se utilizó el Kit "Gigapack® III Gold" (Stratagene, La Jolla, CA). Cada reacción de empaquetamiento se hizo de la siguiente forma:

- ⊕ Sacar del congelador de -80°C un tubo con extracto de empaquetamiento y dejar descongelar lentamente en hielo.
- ⊕ Añadir 2 µl de ADN a empaquetar en el tubo que contiene el extracto. Mezclar pipeteando suavemente.
- ⊕ Centrifugar durante 5 s para que todo el contenido del tubo se sitúe en el fondo y mantener durante 120 min a 20-22°C.
- ⊕ Añadir 500 µl de tampón SM y 20 µl de cloroformo. Titular la suspensión de fagos obtenida con el fin de determinar la eficiencia de empaquetamiento mediante infección en la cepa *E. coli* XL1-Blue MRA(P2).
- ⊕ Almacenar bien a 4°C ó bien a -80°C como se ha indicado anteriormente.

8.1.4 Preparación de las células hospedadoras.

- ⊕ Crecer por aislamiento la cepa *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) en LB sólido a 37°C durante 14-16 h.
- ⊕ Inocular una colonia aislada en 50 ml de medio LB líquido suplementado con 0,2% maltosa¹ y 10 mM MgSO₄. Incubar a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5 -1 (equivalente a 4 – 8 x 10⁸ células/ml) (4 - 6 h).
- ⊕ Recoger las células por centrifugación a 500 x g durante 10 min a 4°C y resuspenderlas en 10mM MgSO₄ hasta alcanzar una D.O._{600nm} = 0,5.

¹ **Maltosa:** es necesaria debido a que la proteína que actúa como receptora del fago está codificada por el gen *lamB*, que se encuentra integrado en el operón que contiene los genes para la utilización de la maltosa.

8.1.5 Infección en medio sólido y titulación de la genoteca.

- ⊗ Preparar una serie de diluciones en medio SM de los fagos empaquetados.
- ⊗ Añadir 1 μ l de cada dilución a 200 μ l de las células hospedadoras preparadas como se indica en el apartado 8.1.4. Incubar a 37°C durante 20 min para permitir la infección.
- ⊗ Añadir 3 ml de medio NZY cobertera previamente fundido y enfriado a 50°C y verter sobre placas de medio NZY sólido. Incubar a 37°C durante 6 - 8 h.
- ⊗ Contar las placas de lisis y determinar el título de la genoteca en ufps/ml (unidades formadoras de placas / ml).

El número de ufps obtenidas como resultado del empaquetamiento del ADN genómico de la cepa Ta37 fue de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ ufps en 500 μ l totales. Teniendo en cuenta que los tamaños de los genomas de las especies de *Trichoderma* cuyo genoma se ha secuenciado oscila entre las 33 y las 40 Mb, supondría que estimando un tamaño medio de inserto de 16 Kb y una probabilidad del 99,99% de que un clon particular esté representado, se habrían conseguido un total de entre 65 y 81 genotecas de la cepa Ta37 en esta reacción de empaquetamiento (Clarke y Carbon 1976).

8.2 Hibridación de la genoteca con sondas de ADN.

Para localizar un determinado fragmento de ADN dentro de la genoteca, se hizo una hibridación de la sonda adecuada con el ADN contenido en las placas de lisis resultantes de la infección. Se hicieron 2 rondas de infección para afinar al máximo la detección de los clones positivos.

8.2.1 Infección en medio sólido para hibridar.

- ⊗ Infectar 200 μ l de células *E. coli* XL1- Blue MRA (P2) frescas ($D.O_{600} = 0,5$ en $MgSO_4$ 10mM) con la cantidad necesaria de la genoteca para tener 30.000 ufps por placa. Incubar a 37°C durante 20 min.
- ⊗ Preparar placas de 150 mm de diámetro con medio NZY sólido e incubarlas a 37°C mientras dure la infección.
- ⊗ Añadir a las células 6,5 – 7 ml de medio NZY de cobertera, mezclar muy suavemente por inversión y verter sobre las placas de NZY previamente calentadas a 37°C. Incubar a 37°C 6 - 8 h (hasta que las placas de lisis sean transparentes y confluyentes pero sigan siendo individuales).

8.2.2 Transferencia, hibridación y revelado.

- ⊗ Depositar una membrana de nylon (Roche, Basilea, Suiza) directamente sobre la placa de medio NZY, con mucho cuidado de que no queden burbujas de aire, y mantenerla durante 3 min. Mientras tanto, con una aguja impregnada en tampón de carga 6X, agujerear asimétricamente la membrana y el medio para luego poder solaparlos correctamente. Depositar una nueva membrana sobre la placa, dejarla durante 5 min (para tener 2 copias).
- ⊗ Levantar la membrana, con mucho cuidado de no arrancar el medio, y guardar la placa a 4°C hasta su uso.
- ⊗ Hacer los lavados de las membranas sin agitación en una bandeja con papel Whatmann® 3MM impregnado en cada una de las siguientes soluciones:

Solución desnaturalizante	3 min
Dejar secar la membrana sobre papel de filtro	
Solución neutralizante	5 min
Dejar secar la membrana sobre papel de filtro	
Solución neutralizante	5 min
Dejar secar la membrana sobre papel de filtro	
2XSSC	10 min

- ⊗ Fijar el ADN a la membrana con luz UV en un *Stratalinker* (Stratagene; La Jolla, EE.UU.) aplicando 2 pulsos de 120 mJ cada uno.
- ⊗ Realizar los pasos de prehibridación, hibridación con la sonda marcada con DIG y revelado tal y como se indica en los apartados 7.2.10.3. y 7.2.10.4.

8.2.3 Aislamiento de placas de lisis positivas y segunda ronda de infección.

- ⊗ Picar las placas de lisis positivas con ayuda de una punta de micropipeta P-1000 truncada y estéril e introducirlas en un microtubo con 200 µl de medio SM. Incubar a 4°C durante 2-4 h para permitir la difusión del fago.
- ⊗ Segunda ronda de infección: hacer la infección en placa de 90 mm de diámetro siguiendo las instrucciones indicadas en el apartado 8.2.1., utilizando 10 µl de la suspensión de los fagos positivos.
- ⊗ Hacer la transferencia, la prehibridación, la hibridación y el revelado como se indica en el apartado 8.2.2.

8.3 Aislamiento del ADN de los clones positivos.

El siguiente paso es la obtención del ADN de los fagos que hibridan con la sonda. Para ello se realiza una amplificación del bacteriófago que contiene el ADN de interés y una infección en medio líquido para obtener dicho ADN.

8.3.1 Amplificación de los bacteriófagos de interés.

- ⊗ Hacer otra infección en placas grandes (apartado 8.2.1.) con 10-100 μ l de la suspensión de fagos positivos en medio SM y 200 μ l de células *E. coli*.
- ⊗ Añadir sobre las placas con halos de lisis confluyentes 10 ml de medio SM e incubar en agitación muy suave a temperatura ambiente durante al menos 1 h para permitir la difusión del fago.
- ⊗ Recoger en un tubo el medio SM más la cobertera (aproximadamente 30 ml), añadir un 2% de cloroformo, mezclar y centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Recoger el sobrenadante.

8.3.2 Obtención del ADN de los bacteriófagos de interés.

Para ello se llevó a cabo una infección en medio líquido.

- ⊗ Infectar 1×10^9 células con 10^7 ufps, mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 20 min.
- ⊗ Inocular la infección en un matraz de 500 ml con 100 ml de medio NZY. Incubar a 37°C y 250 rpm durante 4 – 6 h, hasta que se produzca la lisis celular (el medio se aclara y se ve la formación unos hilillos con los restos celulares lisados).
- ⊗ Añadir a cada matraz 200 μ l de solución L1¹ e incubar a 37°C durante 1 h.
- ⊗ Transferir el cultivo a un tubo de centrifuga tipo GSA, filtrando previamente a través de nytal, añadir 6 ml de solución L2², previamente enfriada, e incubar en hielo durante 1 - 12 h.
- ⊗ Centrifugar a 8.000 rpm y 4°C durante 10 min para precipitar los fagos. Eliminar el sobrenadante.
- ⊗ Resuspender en 1,8 ml de L3³. Hacer una extracción con CIA (para eliminar el PEG) y recoger la fase superior.
- ⊗ Añadir 1,8 ml de SDS al 4% (p/v) para lisar los fagos, mezclar suavemente e incubar a 70°C durante 20 min, enfriando después en hielo.
- ⊗ Añadir 1,8 ml de solución L4⁴, mezclar suavemente por inversión (es muy importante no agitar en este punto) y centrifugar a 15.000 rpm y 4°C durante 30 min. Recoger la fase superior.

- ⊗ Tratar con fenol neutro (elimina las cápsidas de los fagos), agitar suavemente durante 5 min, centrifugar 5 min. Tratar con Fenol-CIA (2 veces) y CIA y precipitar con 0,7 volúmenes de isopropanol. Centrifugar inmediatamente a 13.200 rpm durante 10 min. Lavar con EtOH 70%, secar el precipitado durante 5 min y resuspender en 200 µl de TE 1X.

¹ **Solución L1:** ARNasa A –ADNasa I 20-1 mg/ml; BSA 0,2 mg/ml; EDTA 10 mM; Tris-HCl 100 mM pH 7.5; NaCl 300 mM.

² **Solución L2:** PEG 6.000 al 30% (p/v); NaCl 3M.

³ **Solución L3:** Tris-HCl 100 mM pH 7.5; NaCl 100 mM; EDTA 25 mM.

⁴ **Solución L4:** acetato potásico 2,55 M pH 4,8.

9 Transformación genética de microorganismos.

9.1 Transformación genética de bacterias.

9.1.1 Transformación genética de *E. coli*.

9.1.1.1 Obtención de células competentes.

Para introducir ADN exógeno en *E. coli* lo primero que hay que hacer es inducir el estado de competencia en estas células, estado en el que permiten el paso del ADN exógeno a través de sus barreras externas. El método utilizado se basa en el descrito por Inoue *et al.*, 1990. Es muy importante realizar todo el proceso manteniendo la temperatura a 4°C.

- ⊗ Sembrar por aislamiento la cepa *E.coli* DH5-α en medio LB e incubar a 37°C durante 12 - 16 h.
- ⊗ Preparar un preinóculo con una colonia aislada de *E. coli* DH5-α en 5 ml de medio SOB. Incubar a 37°C y 250 rpm toda la noche.
- ⊗ Inocular 100 ml de SOB con 0,5 ml del cultivo. Poner a incubar a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,42 – 0,46 (tarda unas 2 h ó 2,5 h).
- ⊗ Una vez alcanzada la D.O._{600nm}, mantener los matraces en hielo 15 min para parar el crecimiento.
- ⊗ Centrifugar a 5000 rpm y 4°C durante 5 min.
- ⊗ Eliminar el sobrenadante y resuspender en 30 ml de solución RF1¹. Mantener en hielo 30 min.
- ⊗ Volver a centrifugar y resuspender en 8 ml de solución RF2².
- ⊗ Manteniendo las células en hielo y en campana de flujo laminar, hacer alícuotas de 200 µl y congelar inmediatamente con nitrógeno líquido. Guardar a -80°C.

¹ **Solución RF1:** 12 g RbCl; 9,9 g MnCl₂ · 4H₂O; 30 mM acetato potásico; 1,5 g CaCl₂ · 2H₂O; 150 g glicerol; hasta 100 ml agua MilliQ. Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético y esterilizar por filtración.

² **Solución RF2:** 10 mM MOPS; 1,2 g RbCl; 11 g CaCl₂ · 2H₂O; 150 g glicerol; hasta 100 ml agua MilliQ. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH y esterilizar por filtración.

9.1.1.2 Transformación genética de *E. coli*.

La técnica empleada fue descrita por Hanahan en 1983.

- ⊗ Descongelar un vial de células competentes de *E.coli* DH5- α en hielo.
- ⊗ Añadir el ADN (hasta un máximo de 20 μ l) y mantener la mezcla en hielo durante 30 min.
- ⊗ Aplicar un choque térmico de 45 seg a 42°C e inmediatamente poner en hielo 3 min.
- ⊗ Añadir 800 μ l de medio LB líquido e incubar a 37°C y 250 rpm durante 1 h para permitir el crecimiento de la bacteria y la expresión de la resistencia al antibiótico de selección.
- ⊗ Plaquear las células en placas de LB suplementadas con el/los antibióticos adecuados e incubar a 37°C durante 12 - 16 h.

9.1.2 Transformación genética de *A. tumefaciens* AGL1.

9.1.2.1 Preparación de las células electrocompetentes de *A. tumefaciens*.

Se siguió el protocolo propuesto por Mozo y Hooykaas (1991):

- ⊗ Sembrar la cepa AGL1 en medio LB sólido suplementado con 100 μ g/ml de carbenicilina e incubar a 30°C durante dos días.
- ⊗ Inocular 100 ml de LB con 1 colonia e incubar toda la noche a 30°C y 250 rpm.
- ⊗ Inocular 100 ml de medio LB fresco contenido en un matraz de 500 ml con 3 ml del cultivo anterior e incubar a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5. Una vez obtenido el valor de D.O., mantener el cultivo en hielo durante 15 minutos.
- ⊗ Recoger las células por centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C. Resuspender el precipitado en 45 ml de agua estéril y centrifugar de nuevo a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se repitió este proceso una vez más con el mismo volumen de agua estéril.
- ⊗ Después del último lavado con agua, realizar un lavado de las células con 35 ml de glicerol al 10%. Volver a centrifugar a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C. Resuspender el precipitado en 1 ml de glicerol al 10%.
- ⊗ Por último, preparar alícuotas de 40 μ l cada una y congelar con nitrógeno líquido. Almacenar a -80°C, manteniéndose así viables durante varios meses.

9.1.2.2 Transformación por electroporación de *A. tumefaciens*.

- ⊙ Descongelar en hielo un vial de las células electrocompetentes. Añadir 30 μ l de las células a aproximadamente 50 ng del plásmido a transformar. Mezclar suavemente y transferir a las cubetas de electroporación (Bio-Rad, Hércules, EE.UU) de 0,1 cm previamente enfriadas.
- ⊙ Llevar a cabo la electroporación en un electroporador Gene Pulser XCell™ (Bio-Rad, Hércules, EE.UU.) en las siguientes condiciones: 200 Ω , 25 μ F y 2,4 kV.
- ⊙ Transferir las células electroporadas inmediatamente a 1 ml de medio SOB e incubar a 30°C durante 3 horas a 250 rpm.
- ⊙ Sembrar en placas de medio LB suplementado con el antibiótico de selección adecuado e incubar durante 36-48h a 30°C.

9.2 Transformación genética de hongos filamentosos.

9.2.1 Transformación mediada por *A. tumefaciens* AGL1.

Este protocolo fue modificado y puesto a punto en nuestro laboratorio (Cardoza *et al.*, 2006), y está basado en el propuesto por de Groot *et al.*, (1998).

9.2.1.1 Preparación de *A. tumefaciens* AGL1.

- ⊙ Sembrar por aislamiento la cepa *A. tumefaciens* que contiene el vector de interés en medio mínimo sólido (MM, Hooykaas *et al.*, 1979) suplementado con carbenicilina 100 μ g/ml y el antibiótico de selección adecuado. Incubar las placas durante 36-48 h a 30°C.
- ⊙ Inocular 1 colonia en un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml de MM líquido + antibiótico. Incubar a 30°C y 250 rpm durante 24 h.
- ⊙ Medir la D.O._{660nm} del cultivo: debe ser igual o superior a 0,5.
- ⊙ Repartir el cultivo en dos alícuotas de 50 ml. Centrifugar a 4500 rpm durante 5 min y resuspender en la cantidad necesaria de medio de inducción (MI) líquido (Hooykaas *et al.*, 1979), con 200 μ M de acetosiringona (o sin AS para los controles negativos), para obtener una D.O._{660 nm} de 0,5. La AS es el compuesto que activa los genes de virulencia de *A. tumefaciens*.
- ⊙ Incubar la inducción a 30°C y 250 rpm durante 6 horas.

9.2.1.2 Transformación de Ta37.

- ⊙ Preparar placas de MI sólido \pm 200 μ M AS. Una vez secas, colocar filtros negros estériles de nitrocelulosa de 0,8 μ m de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Millipore) sobre ellas con una pinza sin dejar burbujas (previamente, los filtros se humedecieron en MI líquido con o sin AS, según corresponda).
- ⊙ Obtener una suspensión de esporas de Ta37 en agua y diluir con medio MI líquido \pm AS hasta tener 10^7 esporas/ml.
- ⊙ Una vez transcurrido el tiempo de inducción, mezclar volumen:volumen las células de *A. tumefaciens* con la suspensión de esporas de Ta37.
- ⊙ Mezclar y extender 100 μ l de la mezcla con un asa de vidrio sobre la superficie de la membrana, con cuidado de que no se salga de los límites de ésta. Incubar a 18-19°C durante 48 horas.
- ⊙ Con una pinza estéril, transferir las membranas a medio TSA suplementado con el antibiótico de selección adecuado y cefotaxima 300 μ g/ml (para eliminar las células de *A. tumefaciens*).
- ⊙ Incubar a 28°C el tiempo necesario para que crezcan los transformantes (4-7 días).

9.2.2 Transformación de Ta37 por protoplastos.

El protocolo empleado fue el descrito por Proctor *et al.*, 1999, con algunas modificaciones.

9.2.2.1 Obtención de los protoplastos.

- ⊙ Inocular medio CM con 1×10^9 esporas/ml. Incubar a 28°C y 250 rpm durante 24h.
- ⊙ Centrifugar 25 ml de ese cultivo a 4000 rpm durante 10 min. Eliminar al sobrenadante y resuspender en 25 ml de 0,7M NaCl. Repetir este paso otras 2 veces.
- ⊙ Resuspender en 20 ml de solución de enzimas líticas¹ e incubar a 30°C y 80 rpm 14 h.
- ⊙ Filtrar a través de nylal para eliminar restos de micelio no digeridos.
- ⊙ Centrifugar el líquido resultante a 4000 rpm durante 15 min y resuspender en 20 ml de 0,7M NaCl. Repetir este paso una vez más.
- ⊙ Resuspender en 20 ml STC², volver a centrifugar y resuspender en 1 ml STC. Contar los protoplastos usando una dilución 1/100 (se esperan 2×10^7 protoplastos/ml).
- ⊙ Añadir 1 ml de solución 1³.
- ⊙ Preparar alícuotas de 100 μ l y guardar a -80°C.

¹ **Enzimas líticas:** (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) 5 mg/ml enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*, 25 mg/ml driselasa, y 0,05 mg/ml quitinasa disueltas en 0,7M NaCl.

² **STC:** 8,75 ml sorbitol 2M; 0,125 ml Tris-HCl 1M pH 7,5; 0,625 ml CaCl₂ 1M; en un volumen total de 12,5 ml en agua MilliQ. Esterilizar por filtración.

³ **Solución 1:** mezclar en proporción 8:2 STC y solución 30% PEG⁴ y añadir un 0,1% (v/v) DMSO.

⁴ **Solución 30% PEG:** 2,5 g PEG 8000; 0,1 ml Tris-HCl 1M pH 7,5; 0,5 ml CaCl₂; en un volumen total de 10 ml en agua MilliQ. Esterilizar por filtración.

9.2.2.2 Transformación vía protoplastos.

- ⊙ En tubos estériles de 10 ml, poner 95 μ l de STC en el tubo de reacción y 100 μ l en el tubo control. Añadir hasta 5 μ l del plásmido (se necesitan alrededor de 10 μ g de ADN) en el tubo de reacción. Finalmente añadir 100 μ l de protoplastos a ambos tubos, seguido por 50 μ l de solución 30% PEG. Mezclar muy suavemente.
- ⊙ Incubar a temperatura ambiente durante 15 min y después a 42°C durante otros 15 min.
- ⊙ Añadir 2 ml de solución 30% PEG, mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- ⊙ Añadir 4 ml de STC y mezclar por inversión.
- ⊙ Plaquear los protoplastos: añadir alícuotas de 600 μ l de las reacciones anteriores a 6,7 ml de medio de regeneración fundido (a 50°C) en tubos estériles de 10 ml. Mezclar por inversión y verter sobre placas con 20 ml de medio de regeneración solidificado.
- ⊙ Dejar solidificar e incubar en oscuridad a 20°C durante 24h.
- ⊙ Tras 24h, cubrir las placas (excepto una placa control) con 10 ml de medio 1% agar en agua suplementado con el antibiótico de selección adecuado. Dejar solidificar e incubar a 28°C.
- ⊙ Los transformantes serán visibles tras 5-7 días.

9.3 Transformación genética de levaduras.

El protocolo de transformación de alta eficiencia de levaduras utilizado en este trabajo fue descrito por Gietz *et al.*, 1992.

- ⊙ Sembrar por aislamiento la cepa *S. cerevisiae* INVSc1 en medio YD sólido e incubar a 30°C durante 3 – 4 días.
- ⊙ Inocular una colonia aislada de INVSc1 en 3 ml de medio YD líquido e incubar a 30°C y 200 rpm durante 14 - 16 h.
- ⊙ Inocular 50 ml de medio YD líquido con 1×10^7 células/ml e incubar a 30°C y 200 rpm hasta que la concentración celular sea 2×10^7 células/ml (3- 5 h).
- ⊙ Centrifugar el cultivo a 4.000 rpm y 4°C durante 7 min. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 25 ml de agua destilada estéril.
- ⊙ Volver a centrifugar, resuspender en 1 ml de acetato de litio 100 mM y transferir a un microtubo.
- ⊙ Centrifugar a 13.200 rpm durante 15 s para eliminar el acetato de litio y resuspender en acetato de litio 100 mM hasta alcanzar un volumen de 500 μ l (conteniendo aproximadamente 2×10^9 células/ml), con ayuda de un vórtex.

- ⊙ Hacer alícuotas de 50 μ l, centrifugar para eliminar el acetato de litio y añadir por este orden:

50% (p/v) PEG 8000	240 μ l
Acetato de litio 1M	36 μ l
ADN de espermatozoos de salmón ¹ (2mg/ml)	25 μ l
ADN plasmídico (0,1 μ g/ μ l)	50 μ l

Hacer por duplicado y siempre un control negativo sin añadir el plásmido.

- ⊙ Agitar en vórtex durante 30 s e incubar a 30°C durante 30 min.
- ⊙ Dar un choque térmico a 42°C durante 20-25 min.
- ⊙ Centrifugar a 8.000 rpm durante 15 s para eliminar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua destilada estéril.
- ⊙ Sembrar 200 μ l en placas de medio MD suplementado con leucina, histidina y triptófano. Incubar a 30°C hasta que los transformantes sean visibles (6 – 7 días).

¹ ADN de espermatozoos de salmón: previamente hervido durante 5 min y enfriado en hielo.

10 Purificación y análisis del harzianum A.

10.1 Métodos de extracción del HA.

A lo largo de este trabajo se llevaron a cabo 3 tipos de extracciones del HA, dependiendo de las condiciones del cultivo y del grado de pureza necesitado.

10.1.1 Extracción del HA de forma rutinaria.

- ⊙ Tomar 1 ml de un cultivo líquido de Ta37 en medio PDBs (apartado 6.1.1.3). Centrifugar para recoger el sobrenadante. Guardar el micelio precipitado para medir el peso seco.
- ⊙ Añadir 1 ml de acetato de etilo y agitar en vórtex durante 1 min.
- ⊙ Centrifugar a 13.200 rpm durante 2 min para separar bien las fases y tomar toda la fase superior (aproximadamente 900 μ l).
- ⊙ Evaporar completamente en un SpeedVac a baja temperatura y resuspender en 90 μ l de acetonitrilo. Guardar a -20°C hasta su uso.

10.1.2 Extracción del HA destinado a purificación.

- ⊗ Preparar un cultivo de Ta37 en 1 L de medio PDBs (apartado 6.1.1.3). Filtrar a través de nytal y recoger el sobrenadante.
- ⊗ Mezclar el sobrenadante con 1 volumen de acetona. Agitar vigorosamente y evaporar en rotavapor a temperatura ambiente en condiciones de vacío hasta que el volumen de muestra sea igual o inferior al inicial.
- ⊗ Añadir un volumen de acetato de etilo, agitar y separar las fases formadas en un embudo de decantación. Reservar la fase superior y repetir la extracción con acetato de etilo otras 2 veces con la fase inferior.
- ⊗ Juntar las 3 fases obtenidas y añadir Na_2SO_4 anhidro como desecante. Agitar bien y dejar reposar durante al menos 1 hora.
- ⊗ Filtrar a través de papel Whatmann[®] 3MM y evaporar completamente en rotavapor a temperatura ambiente en condiciones de vacío.
- ⊗ Resuspender el precipitado blanco obtenido en 1/10 del volumen de partida con acetonitrilo y guardar a -20°C hasta su uso.

10.1.3 Extracción del HA a partir de medio sólido.

- ⊗ A partir de cultivos de Ta37 crecido en medio sólido durante 8 días, tomar 8 tacos de agar de 1 cm de diámetro con un sacabocados. Cortar los tacos en trocitos con un bisturí y dividirlos en 2 tubos de 10 ml.
- ⊗ A cada tubo añadir 2 ml de acetato de etilo. Agitar en vórtex durante 1 min y recoger todo el acetato de etilo.
- ⊗ Añadir de nuevo 2 ml de acetato de etilo y poner en plataforma agitadora durante 3 h a temperatura ambiente. Recoger todo el acetato de etilo y juntarlo con el recogido anteriormente.
- ⊗ Evaporar todo en SpeedVac a temperatura media y resuspender en 150 μl de acetonitrilo. Guardar a -20°C .

10.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) que se utilizó en este trabajo fue semipreparativa, si el objetivo era la purificación del HA, o analítica si se trataba del análisis de diferentes muestras.

Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC y antes de su utilización fueron filtrados para eliminar posibles partículas.

Las condiciones de cada cromatografía se indican a continuación y están basadas en el método descrito por Lee *et al.*, 2005, con algunas modificaciones. Ambos métodos cromatográficos constaron de 2 fases, una isocrática en la que eluía el HA y otra en gradiente, que constituía el lavado y el equilibrado de la columna.

10.2.1 HPLC semipreparativa.

<ul style="list-style-type: none"> ⊗ <u>Volumen de inyección</u>: 1 ml (inyección manual) utilizando un <i>loop</i> de 200 μl. ⊗ <u>Flujo</u>: 3 ml/min. ⊗ <u>Columna</u>: ODS-H80 150 x 10 mm I.D. S-4μm, 8nm (YMC Waters). ⊗ <u>Absorbancia</u>: 306 nm.

Tiempo (min)	% Agua + 0,1% TFA	% Acetonitrilo
0	60	40
40	60	40
47	0	100
57	0	100
62	60	40

10.2.2 HPLC analítica.

Normalmente fue necesaria la dilución de la muestra para no superar 1 unidad en el dato de absorbancia y, de este modo, poder hacer una cuantificación fiable del HA con ayuda de una recta patrón.

<ul style="list-style-type: none"> ⊗ <u>Volumen de inyección</u>: 100 μl (inyección manual) utilizando un <i>loop</i> de 20 μl. ⊗ <u>Flujo</u>: 1 ml/min. ⊗ <u>Columna</u>: ODS-H80 150 x 4,6 mm I.D. S-4μm, 8nm (YMC Waters). ⊗ <u>Absorbancia</u>: 306 nm.

Tiempo (min)	% Agua + 0,1% TFA	% Acetonitrilo
0	60	40
30	60	40
40	0	100
45	0	100
50	60	40

10.3 Purificación del HA.

Debido a la inexistencia de estándares comerciales de HA, la purificación de este compuesto se convirtió en uno de los principales objetivos de este trabajo.

- ⊙ Someter a las muestras a HPLC semipreparativa como se indica en el apartado 10.2.1. Será necesario el análisis de cómo mínimo 30 muestras para obtener una cantidad significativa de HA.
- ⊙ Con ayuda de un colector de fracciones, recoger las fracciones comprendidas entre los minutos 34 y 36 de la cromatografía y guardarlas a 4°C hasta su uso.
- ⊙ Combinar todas las fracciones obtenidas y evaporar en un rotavapor a 4°C en condiciones de vacío durante 3 h.
- ⊙ Añadir $\frac{3}{4}$ volumen de diclorometano al volumen resultante, agitar bien y dejar reposar hasta que se separen las fases.
- ⊙ Recoger la fase inferior y añadir Na_2SO_4 anhidro como desecante. Agitar bien y dejar reposar durante 1 hora.
- ⊙ Filtrar a través de papel Whatmann® 3MM y evaporar completamente en rotavapor a 4°C en condiciones de vacío.
- ⊙ Resuspender en acetonitrilo y guardar a -20°C hasta su uso.

11 Identificación de compuestos mediante resonancia magnética nuclear (NMR).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (conocida por sus siglas en inglés, NMR) es una técnica que permite la determinación de estructuras moleculares. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones y/o neutrones (como por ejemplo, átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P). Este tipo de núcleos son magnéticamente activos y, al ser sometidos a un campo electromagnético, absorben radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias. El espectrómetro de NMR detecta esta radiación y la registra como una gráfica de frecuencias frente a la intensidad, que es el llamado espectro de NMR. Como la frecuencia exacta de la absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en la que se encuentran.

Los espectros NMR realizados a lo largo de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- Espectro monodimensional de ^1H : da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalaramente.
- Espectro monodimensional de ^{13}C : al igual que en anterior, da información acerca de los grupos funcionales pero, en este caso, en los que están implicados ^{13}C .

Las medidas para los espectros de NMR para identificar intermediarios de la ruta de biosíntesis del HA fueron llevadas a cabo utilizando acetona deuterada como solvente y trimetilsilano como estándar interno, y se realizaron en el Laboratorio de la Dra. McCormick (USDA-ARS, Peoria, IL, EE.UU.) con el espectrómetro Bruker AMX 500 [500 MHz (RMN- H^1) y 125 MHz (RMN- C^{13})]. Para identificar el HA se empleó el deuterocloroformo como solvente y los espectros de NMR se realizaron en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, en el laboratorio del Dr. Rumbero, con el espectrómetro Bruker WM 500 [500 MHz (RMN- H^1) y 125 MHz (RMN- C^{13})].

12 Antibiograma frente al HA.

Se empleó la levadura sensible a trichotecenos, *K. marxianus* GK 1005 (ATCC 10606) siguiendo el protocolo descrito por Engler *et al.*, 1999.

- ⊙ Sembrar por aislamiento la levadura *K. marxianus* GK 1005 (ATCC 10606) en medio MA sólido e incubar a 30°C durante 3 – 4 días.
- ⊙ Inocular 50 ml de medio MA líquido con una colonia aislada de la levadura. Incubar a 30°C y 250 rpm durante 18 – 20 h.
- ⊙ Medir la densidad celular del cultivo con un espectrofotómetro a D.O._{560nm} (una unidad de D.O._{560nm} corresponde con $1,1 \times 10^9$ células/ml).
- ⊙ Añadir $2,2 \times 10^8$ células/ml a 100 ml de medio MA 1% agar fundido y dejado enfriar a 50°C. Preparar placas con 20 ml de medio.
- ⊙ Con ayuda de un sacabocados, hacer pocillos en el medio de 5,5 mm de diámetro y 3,5 mm de profundidad.
- ⊙ Añadir 60 μ l de las muestras en los pocillos, dejar a 4°C durante 5 h para que difundan e incubar a 30°C durante 14 h para visualizar los halos de inhibición del crecimiento.

13 Experimentos de “feeding”.

Para que los experimentos de expresión génica heteróloga funcionen hay que añadir al medio el sustrato de la actividad enzimática objeto de estudio (*feeding*). A lo largo de este trabajo se realizaron experimentos de *feeding* utilizando como sustratos varios intermediarios de la ruta de biosíntesis de trichotecenos, compuestos amablemente cedidos por la Dra. McCormick.

- ⊙ Inocular 20 ml de medio MD +leucina/histidina/triptófano con una colonia aislada de la levadura INVSc1 e incubar a 30°C y 200 rpm durante 2 días.
- ⊙ Centrifugar a 4.000 rpm durante 10 min para recoger las células y resuspenderlas en 10 ml de medio rico en galactosa¹ (para que se exprese el gen objeto de estudio).
- ⊙ Añadir el sustrato (*feeding*): 0,1 mg/ml de trichodieno en acetona (en el caso del gen *tri4*) o 250 μM de EPT en acetona (en el caso del gen *tri11*).
- ⊙ Incubar a 30°C y 200 rpm.

¹ La galactosa induce la expresión del gen clonado en el plásmido pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

En el caso de *F. verticillioides*, los sustratos se añaden (a las concentraciones indicadas arriba) a un cultivo previamente crecido durante 24 h en 5-GYEP e incubar a 28°C y 200 rpm.

14 Análisis de intermediarios de la ruta de síntesis del HA.

14.1 Métodos de extracción.

A la hora de analizar los metabolitos intermediarios de la ruta de biosíntesis del HA, se llevaron a cabo 2 tipos de extracciones, dependiendo de si se trataba de cultivos de hongos filamentosos o de levaduras.

14.1.1 Extracción de cultivos de levaduras.

- ⊙ Tomar 3 ml de un cultivo de levaduras en medio rico en galactosa y mezclar con un volumen de acetona.
- ⊙ Agitar en vórtex durante 1 min para romper las células y centrifugar a 4.000 rpm durante 5 min.
- ⊙ Recoger todo el sobrenadante y añadir 4 ml de una mezcla hexano:acetato de etilo (85:15).
- ⊙ Agitar en vórtex durante 1 min y recoger la fase superior.
- ⊙ Evaporar el solvente bajo presión reducida y aplicando calor¹. Resuspender el precipitado en 100 - 200 μl de acetato de etilo y analizar por GC-MS.

¹ No calentar las muestras cuando el compuesto a analizar sea trichodieno, ya que es un metabolito volátil.

14.1.2 Extracción de cultivos de hongos filamentosos.

- ⊕ Tomar 3 ml de un cultivo del hongo en PDBs (en el caso de Ta37 y mutantes de esta cepa) o 5-GYEP (en el caso de *F. verticillioides*) y añadir un volumen de acetato de etilo.
- ⊕ Agitar en vórtex durante 1 min y centrifugar a 4.000 rpm durante 5 min.
- ⊕ Tomar la fase superior y evaporarla completamente bajo presión reducida y aplicando calor¹.
- ⊕ Resuspender el precipitado en 100 - 200 µl de acetato de etilo y analizar por GC-MS.

¹ No calentar las muestras cuando el compuesto a analizar sea trichodieno, ya que es un metabolito volátil.

14.2 Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS).

La identificación de los intermediarios de la ruta de biosíntesis del HA se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención y de sus patrones de fragmentación de masa con estándares, tras su análisis mediante GC-MS.

Cuando no se disponía de estándares, los compuestos se purificaron mediante separación en columna de silica gel con una fase móvil de hexano:acetato de etilo (3:1). Una vez puros, se analizaron mediante GC-MS y NMR para su identificación.

Dependiendo del compuesto a analizar, se utilizaron 2 programas diferentes, pero en ambos el gas de la fase móvil fue helio (20:1) y el flujo 20 ml/min.

14.2.1 Detección de isotrichodiol.

Temperatura	Tiempo
120°C	Al inicio
Alcanzar 210°C a una tasa de 15°C/min	Mantener 1 min
Alcanzar 260°C a una tasa de 5°C/min	Mantener 3 min
Tiempo total: 20 min	

14.2.2 Detección de trichodieno, trichodermol e intermediarios no identificados.

Temperatura	Tiempo
120°C	Al inicio
Alcanzar 260°C a una tasa de 25°C/min	Mantener 4,4 min
Tiempo total: 10 min	

15 Ensayos de antagonismo entre hongos filamentosos.

Para llevar a cabo la caracterización de las cepas de *Trichoderma* como antagónicas de diversos hongos fitopatógenos (capacidad antifúngica), se llevaron a cabo varios experimentos complementarios entre sí, comenzando con un análisis de tipo más general para ir avanzando hacia experimentos más específicos.

15.1 Enfrentamientos duales.

Esta técnica se empleó para determinar de modo visual si el crecimiento de una de las cepas enfrentadas prevalecía sobre el crecimiento de la otra. Se trata de un enfrentamiento directo entre los hongos en el que participan tanto el contacto físico entre ambos hongos como la acción de los metabolitos y enzimas secretadas al medio, simulando de este modo las condiciones que se podrían dar durante el encuentro de estos hongos en la naturaleza.

- ⊙ Con ayuda de un sacabocados, cortar tacos de agar de 5 mm de diámetro de la zona de crecimiento activo de una colonia de los hongos a analizar.
- ⊙ Preparar placas de medio sólido PDA o MEA (en el caso de utilizar *B. cinerea*) y colocar sobre ellas un taco de cada uno de los hongos a enfrentar, separados por 5 cm.
- ⊙ Incubar a 28°C durante 8 - 10 días.
- ⊙ Examinar visualmente determinando si alguno de los hongos ha detenido el crecimiento del otro, lo ha rodeado o incluso ha crecido por encima de él.

Esta técnica también se utilizó para analizar las condiciones que se estaban dando en la zona de interacción entre los 2 hongos:

- Se extrajo el ARN del micelio de esa zona para análisis de expresión génica (con ayuda de una espátula estéril se obtuvo el micelio de la zona de interacción de 1 cm de ancho) (Fig. 14.A).
- Se tomaron muestras de medio en esa zona para la determinación de la producción de HA (Fig.14.B).

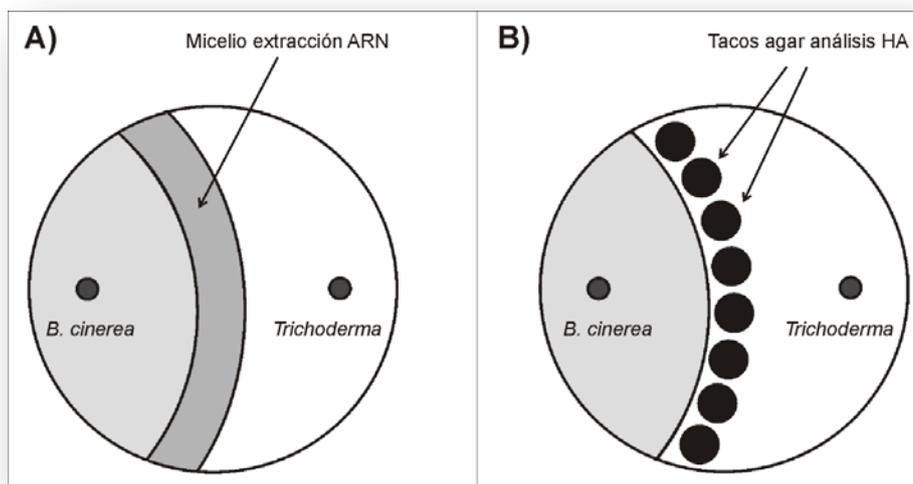


Figura 14. Enfrentamientos duales. A) Zona de interacción de la que se recoge el micelio para el análisis mediante qPCR de los genes *tri*. B) Tacos de agar recogidos de la zona de interacción entre ambos hongos empleados para el análisis de la producción de HA.

Cuando la finalidad fue el análisis de la expresión génica, para facilitar la recogida del micelio, las placas se cubrieron con una membrana de celofán estéril (ver siguiente apartado) sobre la cual se colocaron los tacos de agar.

Cada pareja de hongos se analizó por triplicado.

15.2 Ensayos de crecimiento en membrana.

Se empleó cuando se quiso observar el efecto de compuestos secretados al medio por *Trichoderma* sobre el crecimiento de varios hongos fitopatógenos. Se utilizaron 2 tipos de membranas diferentes:

- **Celofán:** membrana de celulosa que sólo impide el paso a través de ella del micelio, llegando al medio todos los metabolitos y enzimas secretadas por el hongo.
- **Diálisis** (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.): membrana también de celulosa pero que sólo permite el paso de metabolitos menores de 10 kDa, impidiendo que la gran mayoría de las enzimas secretados por el hongo pasen al medio.

De este experimento se obtuvo el dato de **inhibición radial del crecimiento (RI)**, comparando el crecimiento del hongo fitopatógeno habiendo estado previamente presente o no una cepa de *Trichoderma*, mediante la fórmula:

$$\% RI = 100 \times \left\{ \frac{(C - T)}{C} \right\}$$

Siendo C el diámetro de la colonia control; y T el diámetro de la colonia expuesta a los metabolitos producidos por la cepa de *Trichoderma*.

- ⊙ Preparar placas de medio PDA o MEA (en el caso de utilizar *B. cinerea*) y, una vez solidificadas, colocar encima una membrana de celofán o diálisis¹ estéril, con mucho cuidado de que no queden burbujas de aire.
- ⊙ Colocar en el centro de la placa un taco de agar de 5 mm de diámetro proveniente de la zona de crecimiento activo de una colonia de *Trichoderma*. Incubar a 28°C durante 2 días (para permitir el crecimiento de *Trichoderma*² y la secreción de metabolitos al medio). Preparar también unas placas control, con la membrana pero sin el hongo.
- ⊙ Con unas pinzas estériles, retirar la membrana con el micelio de *Trichoderma* (lentamente para que no caigan esporas al medio de cultivo) y, sobre el mismo punto en el que estuvo el taco de agar con *Trichoderma*, colocar un taco de agar con el hongo fitopatógeno, incluidas las placas control.
- ⊙ Incubar a 28°C y medir el diámetro de la colonia cada 24 h. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

¹ **Preparación de las membranas:** con un bisturí cortar las membranas con la forma de la placa de Petri. Las membranas de diálisis hay que sumergirlas en agua y llevarlas a ebullición 3 veces para eliminar los compuestos con los que están impregnadas (glicerol, entre otros). Esterilizar los 2 tipos de membranas con un papel de filtro a cada lado. Para facilitar su manejo, sumergir cada una de ellas en agua MilliQ estéril y, una vez hidratadas, colocarlas sobre las placas con ayuda de unas pinzas estériles.

² **Crecimiento de *Trichoderma* sobre la membrana:** la colonia no puede sobrepasar los límites de la membrana para no contaminar el medio.

15.3 Bioensayo de la actividad del HA frente a *B. cinerea*.

Para determinar si el HA tenía algún efecto directo sobre el crecimiento de *B. cinerea*, se llevó a cabo, por triplicado, el siguiente bioensayo:

- ⊙ Recoger las esporas de un placa de MEA con *B. cinerea*.
- ⊙ Añadir 1×10^5 esporas/ml a 100 ml de medio MEA 1% agar fundido y dejado enfriar a 50°C. Preparar placas con 20 ml de medio.
- ⊙ Con ayuda de un sacabocados, hacer pocillos en el medio de 5,5 mm de diámetro y 3,5 mm de profundidad.

- ⊙ Añadir en los pocillos 60 μ l de diversas diluciones de HA en acetonitrilo, dejar a 4°C durante 5 h para que difundan las muestras e incubar a 28°C durante 7 días para visualizar los halos de inhibición del crecimiento.

15.4 Ensayos de inhibición de la germinación de esporas.

Se utilizó esta técnica para determinar si los metabolitos producidos por las cepas de *Trichoderma* afectan no sólo al crecimiento de *B. cinerea*, sino también a la germinación de sus esporas.

- ⊙ Recoger sobrenadantes de cultivos de 24 h en PDBs de *Trichoderma* y esterilizarlos por filtración a través de filtros Millex[®]-GV (Millipore).
- ⊙ Recoger las esporas de un placa de MEA con *B. cinerea* y preparar una solución de esporas a una concentración de 60 esporas/ μ l en tampón de germinación¹.
- ⊙ Hacer el ensayo en una placa de microtiter, mezclando en cada pocillo:

Sobrenadante filtrado	5 – 25 μ l
Solución de esporas (60 esp/ μ l)	5 μ l (300 esporas)
Medio PDBs	hasta 100 μ l
- ⊙ Sellar la placa con film transparente para conservar una alta humedad e incubar a 22°C durante 16 - 18 h, en oscuridad.
- ⊙ Observar mediante microscopio invertido a 4X aumentos para determinar el efecto de los sobrenadantes sobre la germinación de las esporas.

¹ **Tampón de germinación:** 20 mM glucosa; 20 mM KH₂PO₄.

16 Cuantificación del ergosterol y del escualeno intracelulares.

Para la medición del ergosterol y del escualeno, se extrajeron los esteroides intracelulares y posteriormente se llevó a cabo la cuantificación del contenido de cada uno de los compuestos mencionados. Las mediciones fueron hechas por triplicado.

- ⊙ Inocular 100 ml de medio CM con 1×10^7 esporas/ml de las diferentes cepas de *Trichoderma* durante 24 h.
- ⊙ Inocular 100 ml de PDBs con 20 ml del preinóculo de 24h e incubar a 28°C y 250 rpm durante 24 – 96 h.

- Para hallar el contenido de escualeno (S), la concentración μM inicial es la obtenida a partir de la recta patrón (ver Resultados del Capítulo 2, apartado 3.4) y se corresponde con los μmoles de escualeno por litro de volumen extraído (μM_1).

$$\mu\text{M S} = \frac{\left[\frac{\left(\frac{\mu\text{M}_1 \text{ S } (\mu\text{mol S/L})}{1000 \text{ ml/L}} \right) \times 3 \text{ ml}}{0,5 \text{ g micelio}} \right] \times \text{g peso húmedo total}}{\text{ml totales de cultivo}} \times 10^3 \text{ ml/L}$$

Teniendo en cuenta que el volumen extraído es de 3 ml, se calcula el valor final de μM (μM_F) como los μmoles de escualeno por litro de cultivo.

$$\text{mg S/g peso húmedo} = \frac{\left[\frac{\left(\frac{\mu\text{M}_F \text{ S } (\mu\text{mol S/L})}{1000 \text{ ml/L}} \right) \times 3 \text{ ml}}{0,5 \text{ g peso húmedo}} \right] \times 410 \mu\text{g S}/\mu\text{mol S}}{1000 \mu\text{g S/mg S}}$$

17 Determinación de actividades enzimáticas.

17.1 Cuantificación del contenido proteico.

La concentración proteica de las muestras se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford (1986), basado en el cambio de máxima absorbancia, de 465 a 595 nm, de una solución ácida de azul Coomassie R-250 al unirse a proteínas.

- Ⓞ Preparar diluciones de las muestras en agua MilliQ, en un volumen final de 800 μl .
- Ⓞ Cuando todas las muestras estén preparadas, añadir 200 μl del reactivo Bradford (BioRad), mezclar por inversión e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Ⓞ Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm.
- Ⓞ Cuantificar la concentración proteica extrapolando los datos obtenidos en una recta patrón de concentraciones conocidas de la proteína ovoalbúmina frente a su absorbancia a 595nm.

17.2 Determinación colorimétrica de la actividad quitinasa.

17.2.1 Obtención de las muestras.

Se concentraron 2 ml de sobrenadante de cultivos de las diferentes cepas de *Trichoderma* en PDBs utilizando columnas Amicon®Ultra (Millipore). Se hizo un lavado con Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y las proteínas se recogieron en 100 µl de ese mismo tampón. Se guardaron a -20°C hasta su utilización.

17.2.2 Ensayo colorimétrico.

La actividad extracelular quitinasa fue cuantificada utilizando *p*-nitrofenil-β-D-glucosaminida (*p*-NF-βDG) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.) como sustrato, preparado a 12,5 mM en metanol:Tris-HCl 50 mM pH 6,0 (1:1).

La hidrólisis del *p*-NF-βDG por acción de la actividad quitinasa da lugar a la formación de *p*-nitrofenol (*p*-NF), compuesto que tiene una absorbancia máxima a 410 nm.

En un microtubo se añadieron:

Muestra	50 µl
Sustrato <i>p</i> -NF-βDG	1 mM
Tris-HCl 50 mM pH 6,0	Hasta 500 µl

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 h, se paró con 500 µl de metanol y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro a 410 nm de longitud de onda.

La actividad quitinasa fue cuantificada extrapolando los datos de absorbancia a 410 nm en una recta patrón de *p*-NF (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.) preparado en tampón metanol:Tris-HCl 50 mM pH 6,0 (1:1).

En todos los casos, la interferencia producida por la degradación no enzimática del sustrato fue determinada en un ensayo paralelo preparando una mezcla de reacción con un extracto proteico que había sido inactivado previamente por calor (100°C durante 5 min) y su absorbancia fue sustraída a la obtenida en las muestras analizadas.

La actividad quitinasa total fue calculada como nanomoles de *p*-NF formados en 1 min por ml y la actividad específica como nanomoles de *p*-NF formados por min de reacción y mg de peso seco.

17.3 Determinación espectrofotométrica de la actividad HMG-CoA reductasa.

17.3.1 Obtención de las muestras.

- ⊙ Preparar cultivos de las diferentes cepas de *Trichoderma* en 100 ml de PDBs.
- ⊙ Recoger el micelio por filtración a través de nytal, lavar con NaCl 0,9% y secar entre papeles de filtro.
- ⊙ Pulverizar el micelio en un mortero con nitrógeno líquido y resuspenderlo en tampón de homogeneización¹ suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas² (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.).
- ⊙ Incubar en hielo durante 90 min, centrifugar a 1000 x g durante 5 min y recoger el sobrenadante.
- ⊙ Finalmente, centrifugar de nuevo durante 15 min a 8000 x g, recuperar el sobrenadante.

¹ **Tampón de homogeneización:** tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0; 0,5% Tritón X-100; 1 mM EDTA; 10 mM ditioneitol (DTT).

² **Cóctel de inhibidores de proteasas:** 0,5 mM 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluorido (AEBSF); 2,5 mM 1,10-fenantrolina; 11 μM pepstatina; 7 μM proteasa cisteína E-64.

17.3.2 Ensayo enzimático.

La actividad HMG-CoA reductasa fue determinada siguiendo el protocolo descrito por Servouse y Karst (1986) con ligeras modificaciones.

La mezcla de reacción se preparó en un microtubo:

NADPH	150 μM
Muestra	100 μl
HMG-CoA ¹	100 μM
Tampón de homogeneización	hasta 500 μl

¹ Antes de añadir la HMG-CoA a la mezcla, se midió la absorbancia a 340 nm para sustraer la oxidación endógena del NADPH.

La reacción se incubó a 30°C y la absorbancia se midió cada 5 min a 340 nm durante 60 min para determinar la tasa de oxidación del NADPH. La actividad se calculó con la fórmula:

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{(a_m)(L)}$$

Donde ΔA corresponde a la tasa de oxidación del NADPH y a_m al coeficiente de absorción del NADPH, que a 340 nm tiene un valor de $6,22 \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$ (Segel, 1968).

La actividad HMG-CoA reductasa específica fue determinada como los nmoles de NADPH oxidado por min de reacción y por mg de proteína.

18 Ensayos con plantas de tomate.

18.1 Esterilización de las semillas.

Para eliminar los posibles contaminantes de la superficie de las semillas que pudieran interferir en los experimentos posteriores, se esterilizaron mediante el siguiente protocolo:

- Ⓢ Introducir las semillas en un tubo de 10 ml y añadir 5 ml de etanol 70%. Agitar en el thermomixer durante 10 min.
- Ⓢ Eliminar el etanol 70%, añadir 5 ml de hipoclorito sódico 50% y agitar de nuevo durante 10 min.
- Ⓢ Eliminar el hipoclorito sódico, añadir 5 ml de agua MilliQ estéril y agitar de nuevo. Repetir este paso otras 2 veces para eliminar completamente el hipoclorito sódico.
- Ⓢ Dejar secar las semillas bajo campana de flujo laminar.

18.2 Cultivos hidropónicos.

Con el fin de analizar la expresión de los genes *tri* de varias cepas de *Trichoderma* en contacto con las plantas de tomate, se llevaron a cabo cultivos hidropónicos con dichas plantas según lo descrito por Rubio *et al.*, 2012.

- Ⓢ Preparar las cajas Phytatray II (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.) con 100 ml de medio MS y en el centro una rejilla de acero inoxidable sobre la que se coloca una gasa estéril en contacto con el reservorio de medio MS (Fig. 15), todo en condiciones de esterilidad.

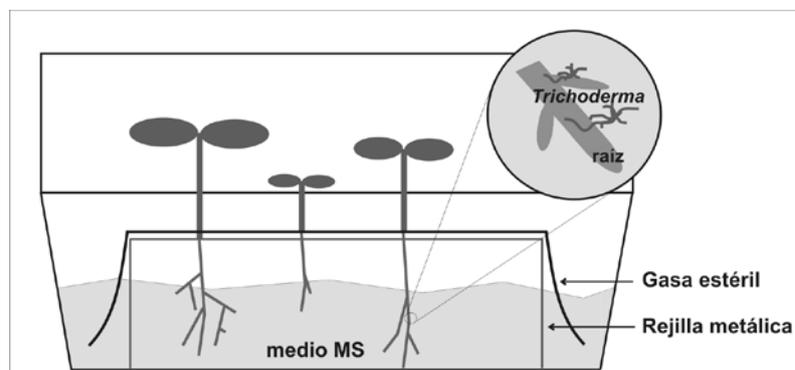


Figura 15. Cultivo hidropónico.

- ④ Colocar 30 semillas estériles sobre la gasa (las semillas quedan a aproximadamente a 1 cm de la superficie del medio MS). Incubar en cámara de fitotecnia durante 2 semanas bajo las condiciones indicadas en el apartado 6.3.
- ④ Recoger el micelio de un cultivo de 48 h de *Trichoderma* en PDBs mediante filtración a través de nytal y lavarlo con agua MilliQ estéril para eliminar los restos de medio.
- ④ Añadir el micelio al medio MS de las cajas Phytatray con las semillas germinadas (las raíces ya están sumergidas en el medio). Incubar a 25°C y 80 rpm durante 20 h con 16 h de luz.
- ④ Cortar las raíces y sumergirlas en agua MilliQ fría. Con mucho cuidado, desprender el micelio adherido a las paredes de las raíces. Recoger el micelio, eliminar el agua y congelar a -80°C hasta su uso para extraer ARN.

18.3 Cultivo de plantas de tomate sobre sustrato.

18.3.1 Pildorado de las semillas.

Para estudiar el efecto de las diferentes cepas de *Trichoderma* sobre las plantas de tomate, las semillas se cubrieron con una capa de esporas (pildorado).

Las semillas esterilizadas se sumergieron en una suspensión de esporas de *Trichoderma* de 2×10^8 esporas/ml en tampón de germinación (1 ml por cada 30 semillas). Se esperó hasta que se evaporara todo el líquido bajo cabina de flujo laminar (aprox. 12 h).

18.3.2 Medición de los parámetros de la planta.

Se quiso evaluar si las diferentes cepas de *Trichoderma* tenían algún efecto sobre la germinación o el crecimiento de las plantas de tomate. Para ello se sembraron las semillas pildoradas con esporas de las diferentes cepas en sustrato Kekkilä 50/50 (Projar S.A., Valencia, España) (32 semillas por condición) y se mantuvieron en una cámara fitotécnica, bajo las condiciones descritas en el apartado 6.3., durante 4 semanas, regando con agua + 0,1% (p/v) abono a conveniencia.

Tras ese tiempo se midieron en las plantas los parámetros de porcentaje de germinación de las semillas, longitud del tallo y grosor del tallo.

18.3.3 Inoculación del patógeno *B. cinerea*.

Para analizar el efecto de las cepas de *Trichoderma* sobre la infección de las plantas de tomate por parte del hongo *B. cinerea*, se simuló las condiciones de infección del fitopatógeno inoculando sus esporas en las hojas de tomate.

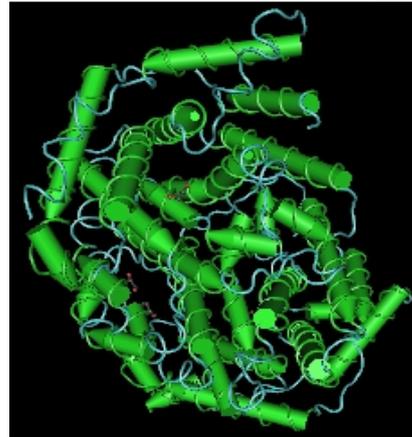
- ④ Sembrar semillas de tomate sin pildorar en sustrato y mantenerlas en cámara fitotécnica a $21,5 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% de humedad relativa y 16 h de fotoperiodo.
- ④ Cortar hojas de las plantas de 18 días (siempre del segundo nivel) y colocarlas en placas de Petri con 2 papeles de filtro en el fondo, previamente humedecidos con 5 ml de agua destilada.
- ④ Inocular las hojas con 15 μl de una suspensión de esporas de *B. cinerea* a 5×10^5 esporas/ml en tampón de germinación. Dejar secar la gota.
- ④ En el mismo sitio, añadir 15 μl de sobrenadante esterilizado por filtración obtenido a partir de un cultivo de 24 h en PDBs de las diferentes cepas de *Trichoderma*. Dejar secar la gota.
- ④ Incubar en cámara de fitotecnia a $21,5 \pm 2^\circ\text{C}$ y 16 h de fotoperiodo durante 4 días, añadiendo 2 ml de agua destilada a los papeles de filtro cada día para mantener las condiciones de humedad.
- ④ Medir el diámetro de las lesiones cada 24 h.

Se hicieron 3 inoculaciones por hoja, en 12 hojas y 3 réplicas independientes por cada tratamiento.

También se analizó el efecto de las cepas de *Trichoderma* sobre varios genes de defensa de las plantas de tomate durante la infección con *B. cinerea*.

- ④ Inocular hojas de plantas de tomate (del segundo nivel) de 4 semanas con 15 μl de una suspensión de esporas de *B. cinerea* a 5×10^5 esporas/ml en tampón de germinación y dejar secar la gota. Cortar una hoja sin inocular (del segundo nivel) y congelar inmediatamente a -80°C .
- ④ Meter las plantas en cajas transparentes (1 caja por tratamiento), añadir 300 ml de agua + 0,1% (p/v) abono en el fondo, cerrar las cajas y mantener en la cámara de fitotecnia a $21,5 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 h durante 4 días.
- ④ A los 4 días, cortar las hojas inoculadas y congelar inmediatamente a -80°C hasta su uso.
- ④ Extraer el ARN de las hojas, inoculadas y sin inocular, según se indica en el apartado 7.3.1 y analizar mediante PCR a tiempo real.

Capítulo 1



Estructura 3D de la proteína Tri5.

Clonación y caracterización del *cluster* de biosíntesis del harzianum A.

Purificación del harzianum A.

INTRODUCCIÓN

1. Trichotecenos y su biosíntesis.

El conocimiento de la genética, la bioquímica y de la regulación de la síntesis de trichotecenos podría ayudar a disminuir la contaminación de cultivos por parte de estas micotoxinas, estableciendo nuevas estrategias para controlar dicha contaminación, por ejemplo mediante la generación de mutantes no productores o de plantas transgénicas resistentes a las toxinas.

Debido a su importancia como fitopatógeno, la síntesis de los trichotecenos ha sido estudiada principalmente en el género *Fusarium*, habiéndose caracterizado su ruta biosintética tanto a nivel bioquímico como genético.

Mediante diversas técnicas, que incluyeron la obtención por irradiación con luz U.V. de diversos mutantes de *F. sporotrichioides* bloqueados en distintos puntos de la ruta de biosíntesis de la toxina T-2, la purificación de compuestos a partir de cultivos y experimentos de *feeding* con precursores radiactivos, 3 grupos de investigación (USDA de EE.UU.; Zamir y colaboradores, Canadá; y el grupo de Hesketh, UK) establecieron los intermediarios de las rutas de biosíntesis de la toxina T-2 y del DON. Fueron más numerosos los grupos encargados de la caracterización genética de la ruta, utilizando para ello técnicas de hibridación y secuenciación, o la generación de deleciones de genes específicos de la ruta en las cepas productoras, entre otras.

Algunos de los metabolitos purificados estaban implicados en rutas derivadas hacia la formación de trichotecenos modificados como los apotrichotecenos o el sambucinol, mientras que otros eran productos finales (Desjardins *et al.*, 1993). Por ello se cree que estas rutas biosintéticas funcionan más como entramados de reacciones que como simples rutas lineales.

1.1. Agrupación de los genes de biosíntesis de trichotecenos.

A partir de la una librería genómica de la cepa *F. sporotrichioides* NRRL 3299, se aislaron 2 cósmidos solapantes (Cos1-1 y Cos9-1) que contenían el gen *Tox5* (nomenclatura anterior a su denominación actual como *TRI5*). Estos cósmidos fueron transformados en mutantes de *F. sporotrichioides* bloqueados en diferentes pasos de la ruta: en los mutantes MB2972 (*TRI3*) y MB5493 (*TRI4*) se restauraba la síntesis de la toxina T-2, pero no en el mutante MB1716 (*TRI1*). Este resultado demostró la presencia de al menos 2 genes implicados en la síntesis de la toxina T-2 en las cercanías del gen *Tox5*, sugiriendo la agrupación de los genes de biosíntesis en un *cluster* (Hohn *et al.*, 1993), tal y como ocurre con otros genes de síntesis de metabolitos en algunos hongos, como la aflatoxina en *Aspergillus parasiticus* (Skory *et al.*, 1992) o la penicilina en *Penicillium chrysogenum* (Díez *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990). Estos datos establecieron las bases para la búsqueda del resto de los genes implicados en la biosíntesis de trichotecenos, tanto en *F. sporotrichioides* como en *F. graminearum*.

La agrupación en *clusters* de genes relacionados funcionalmente es una característica común en los procariotas, sin embargo es mucho menos prevalente en los organismos eucariotas. Los hongos poseen varias rutas para funciones metabólicas que podríamos definir como dispensables ya que no son necesarias para el crecimiento del hongo y que podrían clasificarse dentro de 2 grandes categorías: el catabolismo de nutrientes de bajo peso molecular como la prolina, y la síntesis de metabolitos secundarios (Keller y Hohn, 1997). Existen diversas hipótesis para explicar la agrupación de genes implicados en rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en hongos. Se cree que la agrupación de estos genes podría responder a la necesidad de regularlos coordinadamente para que la ruta funcione o bien que esa agrupación facilitaría la transferencia horizontal de todos los genes de la ruta a otros organismos (Kimura *et al.*, 2007).

Hasta el momento se han caracterizado los *clusters* de biosíntesis de trichotecenos (genes *TRI*) en 3 especies de hongos: *F. sporotrichioides* (Brown *et al.*, 2004), *F. graminearum* (Kimura *et al.*, 2003) y *Myrothecium roridum* (Trapp *et al.*, 1998). Sin embargo, la organización de los genes dentro del *cluster* difiere bastante entre las diferentes especies, siendo esta diferencia mucho mayor en el caso de *M. roridum*. En *F. sporotrichioides*, la mayoría de los genes se encuentran agrupados en un *cluster* principal, en una región genómica de 26 Kb en la que se encuentran 11 genes *TRI* (Brown *et al.*, 2004), mientras que en *M. roridum* sólo se han identificado 3 genes *TRI* (*TRI4*, *TRI5* y *TRI6*) a lo largo de una región mucho más amplia (40 Kb) (Trapp *et al.*, 1998). Las diferencias en la

organización del *cluster* podrían deberse a la necesidad de utilizar diferentes genes en función de las estructuras particulares de los trichotecenos a sintetizar por cada especie productora.

La ruta de biosíntesis propuesta para la toxina T-2 incluye 15 pasos a partir del FPP, habiéndose caracterizado, hasta el momento, los genes responsables de 10 de ellos. En el género *Fusarium*, los genes de biosíntesis de trichotecenos (genes *TRI*) se encuentran en 3 *loci* diferentes (Fig. 16) (revisado en Kimura *et al.*, 2007 y McCormick *et al.*, 2011):

- El *cluster* principal de genes *TRI*. En una región de 26 Kb se agrupan la mayoría de los genes *TRI*: *TRI4*, *TRI6*, *TRI3*, *TRI11*, *TRI12*, *TRI7*, *TRI10*, *TRI13*, *TRI8*, *TRI9* y *TRI14*.
- Un *cluster* de 2 genes: *TRI1* y *TRI16*.
- Un gen aislado: *TRI101*.

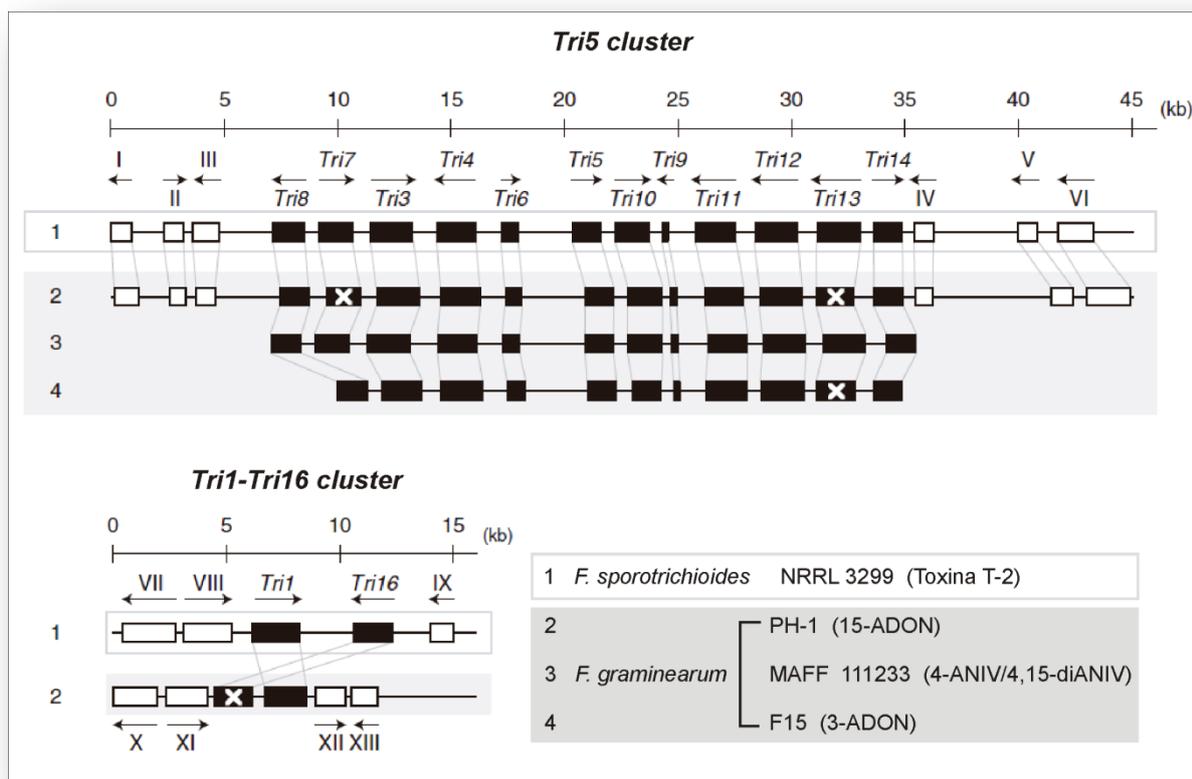


Figura 16. Organización de los *clusters* de biosíntesis de trichotecenos en *F. sporotrichioides* (1) y diferentes quimiotipos de *F. graminearum* (2,3,4) (se indica la cepa y entre paréntesis el trichoteceno producido). Las cajas negras representan los genes *TRI* activos y las cruces blancas indican los genes inactivados por mutación. Las cajas blancas representan genes adyacentes a los *clusters* pero que no están implicados en la síntesis de trichotecenos (para más información sobre estos genes referirse a Kimura *et al.*, 2003; McCormick *et al.*, 2004). Imagen modificada de Kimura *et al.*, 2007. 15-ADON: 15-acetildesoxinivalenol; 4-ANIV: 4-acetilnivalenol; 4,15-diANIV: 4,15-diacetilnivalenol; 3-ADON: 3-acetildesoxinivalenol.

1.2. Ruta de biosíntesis de terpenos.

Al pertenecer al grupo de los sesquiterpenos, los trichotecenos tienen un esqueleto isoprenoide derivado del farnesil pirofosfato (FPP), punto en el cual su biosíntesis se desvía de la ruta general de síntesis de terpenos. El primer intermediario específico de la ruta es el trichodieno, formado por la reacción de ciclación del FPP catalizada por la enzima trichodieno sintasa (codificada por el gen *TR15*). A partir de aquí ocurren una serie de oxigenaciones, ciclaciones, isomerizaciones y esterificaciones que conducen a la formación de los trichotecenos más complejos (Kimura *et al.*, 2007). La ruta biosintética general de los terpenos en hongos podría dividirse en 4 fases:

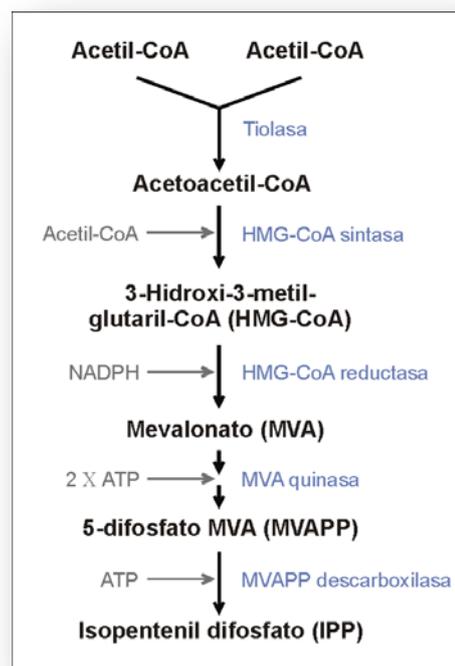
- Síntesis del precursor isopentenil pirofosfato (IPP).
- Unión de varios IPP para dar lugar a una serie de prenil pirofosfatos, intermediarios de las diferentes clases de terpenos.
- Generación de precursores alicíclicos, que constituyen el núcleo de los compuestos finales.
- Modificaciones enzimáticas del núcleo precursor que dan lugar al metabolito final con todas sus características y funciones.

1.2.1. Síntesis del precursor IPP.

En la mayoría de organismos (excepto en algunas especies de algas, eubacterias y plantas), la síntesis de los terpenos comienza con la condensación de 2 moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA), por medio de una tiolasa, para dar lugar al acetoacetil-CoA. Una tercera molécula de acetil-CoA es añadida para formar el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) mediante la acción de la HMG-CoA sintasa. Este compuesto es reducido mediante la HMG-CoA reductasa para dar lugar al mevalonato (MVA). Este último paso es un punto clave de regulación dentro de la ruta de biosíntesis de los terpenos, pudiéndose controlar a nivel transcripcional, traduccional y de degradación enzimática. Además, la actividad HMG-CoA reductasa es inhibida por medio de la acción de antifúngicos como la lovastatina (Cardoza *et al.*, 2007).

El siguiente paso son 2 fosforilaciones secuenciales dependientes de ATP catalizadas por kinasas para dar lugar al mevalonato-5-difosfato. Por último, la acción de la mevalonato-PP descarboxilasa da lugar al IPP, intermediario de 5 carbonos precursor de los terpenos (Fig. 17).

Figura 17. Ruta de síntesis del precursor común de los terpenos, el isopentenil difosfato (IPP). Se muestran las enzimas y compuestos implicados en cada paso.



1.2.2. Unión de unidades de IPP.

Diferente número de unidades de IPP se unen en reacciones de elongación para dar lugar a los diferentes prenil pirofosfatos, precursores de las distintas clases de terpenos (Fig. 18).

- La isomerización del IPP da lugar al dimetilalil pirofosfato (DMAPP), a partir del cual surgen los hemiterpenos de 5 carbonos.
- La combinación de un IPP con un DMAPP genera una molécula de geranil pirofosfato (GPP), compuesto de 10 carbonos precursor de los monoterpenos.
- Adiciones sucesivas de unidades de IPP dan lugar al compuesto de 15 carbonos farnesil pirofosfato (FPP) intermediario de los sesquiterpenos, o al geranilgeranil pirofosfato (GGPP) de 20 carbonos precursor de los diterpenos.
- La condensación de 2 moléculas de FPP da lugar al escualeno, compuesto de 30 carbonos precursor de los esteroides y del resto de los triterpenos.

A partir de la generación de estos precursores, la ruta se bifurca hacia las rutas de biosíntesis específicas de cada familia de terpenos (Cardoza *et al.*, 2005).

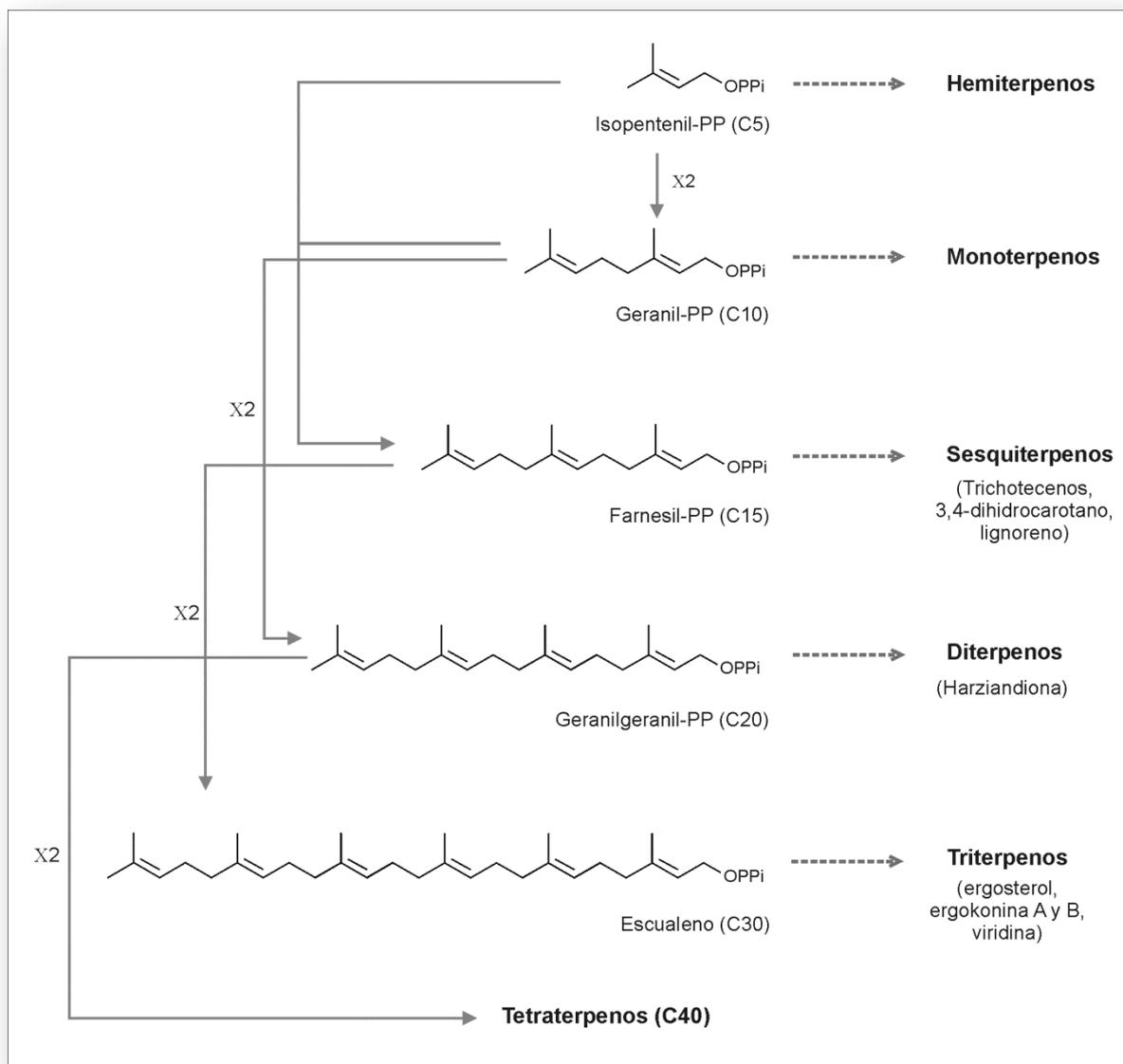


Figura 18. Ruta de biosíntesis de los diferentes prenil pirofosfatos, precursores de los distintos tipos de terpenos en hongos.

1.3. Ruta de biosíntesis de trichotecenos.

Esta ruta comienza con la formación del FPP a partir de acetil-CoA, como se ha indicado anteriormente, a la que siguen una serie de ciclaciones, oxigenaciones, isomerizaciones y esterificaciones que dan lugar a cada uno de los trichotecenos.

A continuación se describen los genes *TRI* caracterizados en *F. sporotrichioides*, así como las enzimas que codifican y las reacciones que llevan a cabo.

1.3.1. El gen *TRI5* (trichodieno sintasa).

El primer paso en la biosíntesis de trichotecenos es la ciclación del FPP para dar lugar al trichodieno. Este hidrocarburo alicíclico fue aislado por primera vez a partir de cultivos de *T. roseum* por Nozoe y Machida en 1970. Mediante experimentos de *feeding* con trichodieno tritiado se demostró su papel como precursor en la síntesis de trichotecina, el trichoteceno producido por esta cepa (Machida y Nozoe, 1972). En 1989, se estableció que el trichodieno participaba también en la síntesis del DON en *F. culmorum*, quedando así confirmado que el trichodieno es el precursor de los trichotecenos (Zamir *et al.*, 1989).

Los primeros trabajos a nivel genético y bioquímico consistieron en el análisis de la trichodieno sintasa (primera enzima específica de la ruta de los trichotecenos) debido a que, al ser el punto de ramificación, podría ser un paso de regulación importante. Los primeros en purificar la enzima y aislar el gen que la codifica (gen *TRI5*) fueron Hohn y colaboradores en 1986 y 1989, respectivamente, en *F. sporotrichioides*.

La trichodieno sintasa cataliza la ciclación del *trans, trans*-FPP para dar lugar al trichodieno (Fig. 19). Pertenece al grupo de las terpeno ciclasas que participan en la biosíntesis de terpenos cíclicos en hongos y plantas, compartiendo con ellas ciertas propiedades como su requerimiento como cofactor de iones Mg^{2+} y su inhibición por pirofosfato (PP) (Cane, 1990).

El gen que codifica para esta enzima ha sido clonado y caracterizado en varias cepas de *Fusarium*, en *Trichothecium roseum* (Tokai *et al.*, 2007), en *Myrothecium roridum* (Trapp *et al.*, 1998) y en *Trichoderma harzianum* (Gallo *et al.*, 2004), entre otras especies.

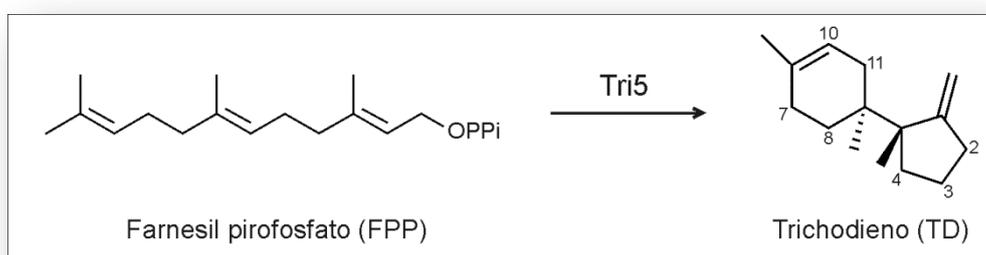


Figura 19. Síntesis del trichodieno a partir del FPP.

1.3.2. El gen *TRI4* (P450 monooxigenasa).

El grupo de Desjardins del USDA demostró que, tras la formación del trichodieno, en las posiciones 1, 12 y 13 se insertaba un oxígeno y en los carbonos C-3, C-4, C-8 y C-15 lo hacía un grupo hidroxilo, derivados todos ellos del oxígeno molecular, para dar lugar a la toxina T-2 (Desjardins *et al.*, 1986). Esto indicaba la participación de enzimas del tipo P450 monooxigenasas (CYP) en las reacciones de oxidación, hecho que quedó confirmado por la acumulación de trichodieno en cultivos de *F. sporotrichioides* tratados con xantotoxina o ancimidol, potentes inhibidores de estas enzimas (Desjardins *et al.*, 1987 y 1988).

Tras la purificación de numerosos intermediarios, se determinó que el siguiente paso en la síntesis de trichotecenos en *Fusarium* es la oxigenación del trichodieno en 4 posiciones diferentes (Fig. 20). Estos 4 pasos de oxigenación se llevan a cabo de forma secuencial: primero se incorpora un grupo hidroxilo en posición 2, luego un epóxido entre los carbonos 12 y 13, después se añade otro hidroxilo en posición 11 (isotrichodiol) y, por último, se incorpora un hidroxilo en posición 3 para dar lugar al isotrichotriol (Hesketh *et al.*, 1993). Los trichotecenos producidos por hongos del género *Fusarium* se diferencian del resto de trichotecenos en que los primeros poseen un grupo hidroxilo en posición C-3. La reacción en la que se produce esta bifurcación es la que utiliza el isotrichodiol como sustrato para generar el primer intermediario tricíclico de la ruta, el isotrichodermol en *Fusarium* o el 12,13-epoxytrichothec-9-ene (EPT) en el resto de especies (Zamir *et al.*, 1990).

El gen *TRI4* se aisló por primera vez a partir de una región genómica de 7,1 Kb que complementaba el mutante de *F. sporotrichioides* MB5493 (*TRI4*) no productor de toxina T-2 (Honh *et al.*, 1995). Presentaba similitud con proteínas de la superfamilia CYP, siendo ésta relativamente baja, por lo que se clasificó dentro del grupo CYP58. La interrupción del gen *TRI4* genera mutantes no productores de trichotecenos que acumulan trichodieno, por lo que es el responsable del segundo paso en la ruta biosintética.

La actividad de esta enzima fue determinada por 2 grupos de investigación. Por un lado, McCormick y colaboradores en el 2006 introdujeron el gen *TRI4* de *F. graminearum* en *Fusarium verticillioides*, hongo no productor de trichotecenos, y descubrieron que convertía el trichodieno exógeno en isotrichodermina, estableciendo así que la enzima Tri4 es una P450 monooxigenasa multifuncional que cataliza todos los pasos de oxigenación del trichodieno hasta la formación del isotrichotriol (Fig. 20). Por otro lado, mediante experimentos de *feeding* con diversos mutantes de *F. graminearum*, se determinó que esta enzima es la responsable de esos 4 pasos secuenciales de oxigenación en el siguiente

orden: grupo –OH en C-2, grupo epóxido entre C-12 y C-13, grupo –OH en C-11 y grupo –OH en C-3 (Tokay *et al.*, 2007).

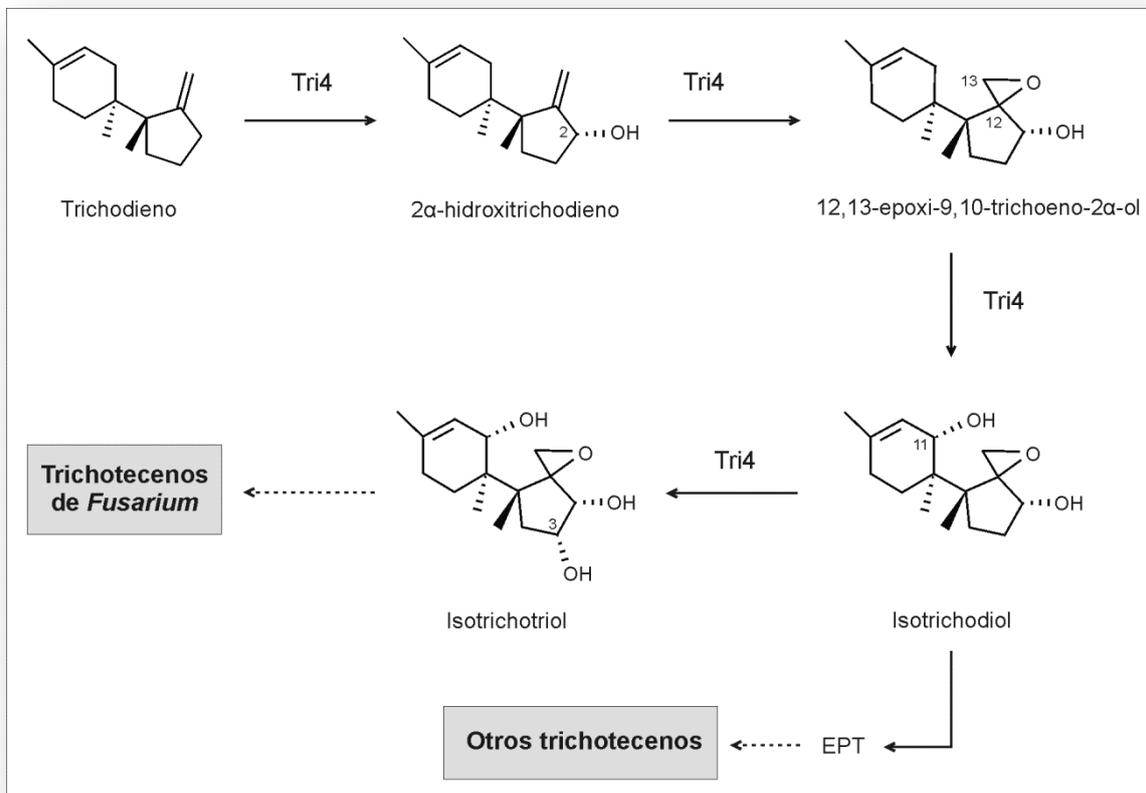


Figura 20. Oxigenaciones catalizadas por la enzima Tri4.

En la síntesis de trichotecenos en *Fusarium*, el siguiente paso es la ciclación del isotrichotriol para formar el primer intermediario tricíclico de esta ruta: el isotrichodermol (McCormick *et al.*, 1990). Esta reacción se lleva a cabo por una vía no enzimática bajo condiciones ácidas. Al principio se pensó que este paso sería llevado a cabo enzimáticamente debido a que los cultivos de *Fusarium* no eran lo suficientemente ácidos como para convertir eficazmente el isotrichotriol en isotrichodermol, sin embargo, no existía un gen dentro del *cluster* que codificara para dicha enzima. Una posible explicación para esta conversión no enzimática podría consistir en una elevada concentración local de isotrichotriol en la membrana del retículo endoplásmico que promoviera esta reacción química incluso en condiciones de acidez moderadas (Kimura *et al.*, 2007).

1.3.3. Los genes *TRI101*, *TRI11* y *TRI3*.

Los 3 pasos siguientes en la síntesis de DON fueron establecidos mediante técnicas bioquímicas por Zamir *et al.*, 1991 (Fig. 21).

- El primero de ellos es la **acetilación en C-3** del isotrichodermol para dar lugar a la isotrichodermina. El **gen *TRI101*** fue identificado al descubrir que la introducción de un determinado fragmento de ADNc en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* confería resistencia a la toxina T-2 (Kimura *et al.*, 1998). Su interrupción en *F. sporotrichioides* no es letal, y el mutante acumula isotrichodermol, indicando que codifica para una 3-O-acetiltransferasa (McCormick *et al.*, 1999). Hasta el momento es el único gen *TRI* que no se encuentra formando parte de un *cluster* con otros genes *TRI*. Esta reacción de acetilación reduce la toxicidad de los trichotecenos de *Fusarium*, por lo que sirve como un mecanismo de autodefensa en los organismos productores (Kimura *et al.*, 1998).
- El siguiente paso es la **hidroxilación en C-15** de la isotrichodermina para dar lugar a la 15-decalonectrina. El **gen *TRI11*** fue aislado inicialmente por hibridación con ARN de *F. sporotrichioides* obtenido a partir de cultivos en fase de producción de trichotecenos. El análisis de la secuencia de aminoácidos codificada por este gen permitió, por similitud con otras proteínas, identificarla como una P450 monooxigenasa de la nueva familia CYP65A1 (Alexander *et al.*, 1998). La interrupción del gen *TRI11* provoca la acumulación de isotrichodermina y la no producción de toxina T-2 en *F. sporotrichioides*, por lo tanto este gen codifica para una C-15 hidroxilasa (McCormick y Hohn, 1997).
- El último de estos pasos es la **acetilación en C-15** de la 15-decalonectrina para dar lugar a la calonectrina. El **gen *TRI3*** se identificó mediante la secuenciación de una región de 4 Kb de ADN genómico que complementaba el mutante MB2972 (*TRI3*) de *F. sporotrichioides* (McCormick *et al.*, 1996). Esta enzima no muestra similitud con otras proteínas en el GenBank, pero contiene la secuencia HxxxDG, conservada en acetiltransferasas. La interrupción del gen *TRI3* da lugar a mutantes no productores de toxina T-2, que acumulan 15-decalonectrina y 3,15-didesacetilcalonectrina, lo que indica que la enzima Tri3 es una 15-O-acetiltransferasa.

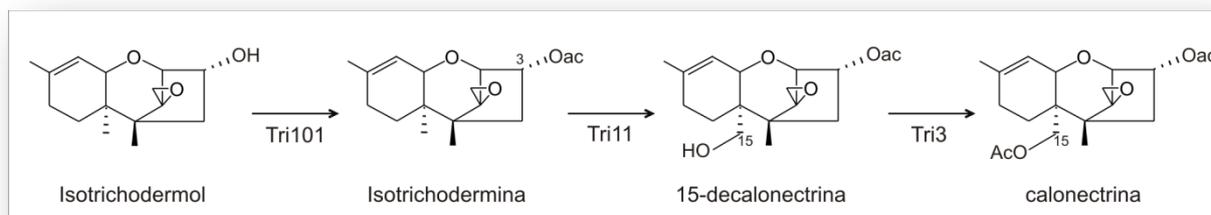


Figura 21. Reacciones catalizadas por las enzimas Tri101, Tri11 y Tri3 en *F. sporotrichioides*.

Tras la formación de la calonectrina, surge una gran variedad estructural de trichotecenos, separándose las rutas de biosíntesis de los tipos A y B, o del DON y el NIV (Kimura *et al.*, 2007). Especies de *Fusarium* emparentadas producen diferentes trichotecenos con distintos patrones de sustituciones en C-3, C-4, C-7, C-8 y C-15. De hecho, la especificidad de algunas enzimas de la ruta por su sustrato difiere entre productores de trichotecenos del tipo A o B.

1.3.4. Resto de genes *TRI* estructurales.

- **Gen *TRI1* (C-8 hidroxilasa en *F. sporotrichioides* y C-7/C-8 hidroxilasa en *F. graminearum*).** Fue descubierto mediante el análisis genético de una serie de mutantes de *F. sporotrichioides* generados por irradiación con luz U.V., no productores de toxina T-2 (Beremand, 1987). Mediante varios estudios (revisados en Kimura *et al.*, 2007), se estableció que la enzima Tri1 participa en la hidroxilación de la calonectrina en C-7 y C-8 en *F. graminearum* y de la hidroxilación en C-7 del 3,4,15-triacetoxiescirpenol en *F. sporotrichioides* (Fig. 22).
- **Gen *TRI7* (4-O-acetiltransferasa).** Fue identificado mediante la comparación de los *clusters* de genes *TRI* entre *F. sporotrichioides* y *F. graminearum*. En el primero se trata de un gen cuya interrupción conduce a la acumulación de hidroxiT-2 (HT-2), en vez de toxina T-2, indicando que la enzima Tri7 es necesaria para la acetilación del oxígeno en C-4 (Brown *et al.*, 2001), acetilación previa a la hidroxilación llevada a cabo por la enzima Tri1 (Fig. 22).

En cepas productoras de 4-acetilnivalenol (4-ANIV) también es responsable de la acetilación en C-4 (Lee *et al.*, 2002). Sin embargo, en cepas de *F. graminearum* productoras de 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON), el *TRI7*

- **Gen *TRI8* (C-3 deacetilasa).** Fue descubierto por comparación entre los *clusters* de las 2 especies de *Fusarium* (Brown *et al.*, 2001). Su interrupción llevó a la conclusión de que codifica para la esterasa responsable de la desacetilación en C-3 de trichotecenos que tienen un grupo acetilo en posición C-15 (McCormick y Alexander, 2002) (Fig. 22).
- **Gen *TRI16* (acetiltransferasa que cataliza la formación de los grupos éster laterales en *F. sporotrichioides*).** Se identificó como una hipotética acetiltransferasa al secuenciar las regiones adyacentes al gen *TRI1*, estableciéndose así el segundo *cluster* de genes *TRI* junto con el gen *TRI1* (Meek *et al.*, 2003). Debido a que los mutantes que carecían de este gen acumulaban neosolaniol, quedó probado que el gen *TRI16* codifica para una acetiltransferasa que lleva a cabo la formación de grupos éster laterales en C-8 (Peplow *et al.*, 2003b) (Fig. 22).

1.3.5. Genes reguladores de la ruta.

- **Gen *TRI6* (factor transcripcional de la familia dedos de zinc).** Fue descubierto al secuenciar una región aguas arriba del gen *TRI5* en *F. sporotrichioides*. La proteína Tri6 contiene un dominio ácido de activación cerca de su extremo N-terminal y 3 regiones similares a motivos de dedos de zinc Cys₂His₂ en su extremo C-terminal (Proctor *et al.*, 1995).

La interrupción del gen *TRI6* en *F. sporotrichioides* dio lugar a mutantes no productores de toxina T-2, cuyos niveles de ARNm de los genes *TRI5* y *TRI4* eran muy reducidos o inexistentes. Estos datos, junto con sus características estructurales, llevaron a la conclusión de que se trata de un activador transcripcional de otros genes *TRI*, cuya secuencia mínima de unión al ADN es YNAGGCC (donde Y es C o T; y N cualquier nucleótido) (Hohn *et al.*, 1999). Posteriormente, esta secuencia consenso se ha encontrado en los promotores de varios genes *TRI* (Brown *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2003).

- **Gen *TRI10* (proteína reguladora).** Fue identificado aguas abajo del gen *TRI5* en *F. sporotrichioides*. No presenta homología con ningún gen conocido pero, a pesar de que en su región promotora no existe la secuencia consenso de unión para la proteína Tri6, esta secuencia sí que está presente en la región codificante del gen *TRI10* (Tag *et al.*, 2001).

La sobreexpresión del gen *TRI10* conlleva un aumento de la síntesis de trichotecenos mediante la acción de la proteína Tri6 sobre otros genes *TRI* y sobre genes implicados en la biosíntesis del FPP a través de la ruta primaria de síntesis de terpenos (ej. HMG-CoA sintasa o mevalonato kinasa) (Peplow *et al.*, 2003a).

Tras la delección del gen *TRI6* en *F. sporotrichioides*, el nivel de expresión del gen *TRI10* se ve incrementado, pudiendo ser que la proteína Tri6 ejerza un control negativo sobre la transcripción del gen *TRI10* al unirse a la secuencia consenso que está dentro de la región codificante del gen, interfiriendo así con su transcripción.

El modelo actual de regulación de la ruta de los trichotecenos describe la activación por parte del gen *TRI10* (por factores que no han sido dilucidados aún) del gen *TRI6* (Tag *et al.*, 2001), que a su vez activa la transcripción de varios genes *TRI* (Hohn *et al.*, 1999), y reprime la transcripción del gen *TRI10*, probablemente debido a un exceso de producto final de la ruta.

Mención especial merece el **gen *TRI15***, ya que se ha descubierto que es un gen regulado por el gen *TRI10* y que codifica un factor de transcripción con 2 motivos de dedos de zinc Cys₂His₂ en su extremo N- terminal, pero no está controlado por el gen *TRI6* y no es necesario para la producción de la toxina (Alexander *et al.*, 2004), por lo que su función todavía no ha sido descrita. Se ha propuesto la hipótesis de que se trate de un regulador negativo de la ruta que se activa por exceso de producto final, reprimiendo así a los genes estructurales y/o genes reguladores.

1.3.6. Gen *TRI12* (transportador de trichotecenos).

Se descubrió mediante la secuenciación de una región de ADN de *F. sporotrichioides* aguas arriba del gen *TRI11*. La proteína que codifica contiene 14 fragmentos transmembrana y presenta una alta similitud con la superfamilia de transportadores MFS (*major facilitator superfamily transporters*) (Alexander *et al.*, 1999).

Su interrupción en *F. sporotrichioides* generó un mutante más sensible a trichotecenos añadidos al medio y cuya producción de toxina T-2 se vio muy disminuida. Por otro lado, su expresión en levaduras no confirió una gran resistencia a los trichotecenos. Teniendo en cuenta estos datos, la proteína Tri12 participa en la exportación de los trichotecenos al

exterior de la célula, pero no juega un papel principal en la autoprotección frente a los mismos.

1.3.7. Genes de función desconocida.

- **Gen TRI14:** no es necesario para la producción de trichotecenos en medio de cultivo, pero sí lo es durante la patogénesis en trigo (Dyer *et al.*, 2005).
- **Gen TRI9:** se descubrió comparando los *clusters* de las 2 cepas de *Fusarium* pero todavía hoy se desconoce su función (Brown *et al.*, 2001).

2. Harzianum A.

En 1994 Corley y colaboradores identificaron un compuesto antifúngico en cultivos de *T. harzianum* ATCC 90237 (actualmente conocida como *T. arundinaceum* ATCC 90237; Degenkolb *et al.*, 2008). Utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear se determinó su estructura, se identificó como harzianum A (HA) y se clasificó dentro del grupo de los trichotecenos. También se estudió su actividad frente a diversos organismos determinándose que no presentaba actividad citotóxica frente células hepáticas de hámster ni actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas ni Gram-negativas, pero sí tenía actividad antifúngica moderada frente a levaduras a una concentración de 100 µg/ml.

Más tarde un grupo de investigadores surcoreanos describieron la producción por parte de *Hypocrea* sp. F000527 de HA y su estereoisómero harzianum B (Lee *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007), y demostraron la capacidad citotóxica de ambos compuestos frente a diversas líneas tumorales humanas, especialmente frente al fibrosarcoma, siendo esta actividad citotóxica mayor en el HA.

El HA pertenece a la clase A de los trichotecenos por tener un enlace simple en el C-8 del esqueleto trichoteceno. Como rasgo característico presenta en C-4 una cola formada por el ácido (2Z,4E,6E)-octa-2,4,6-trienedioico (Fig. 23). Este ácido fue descubierto en forma libre en cultivos de especies de *Trichoderma* productoras de HA, lo que indica que se añade a la posición C-4 del trichodermol en un solo paso (Nielsen *et al.*, 2005).

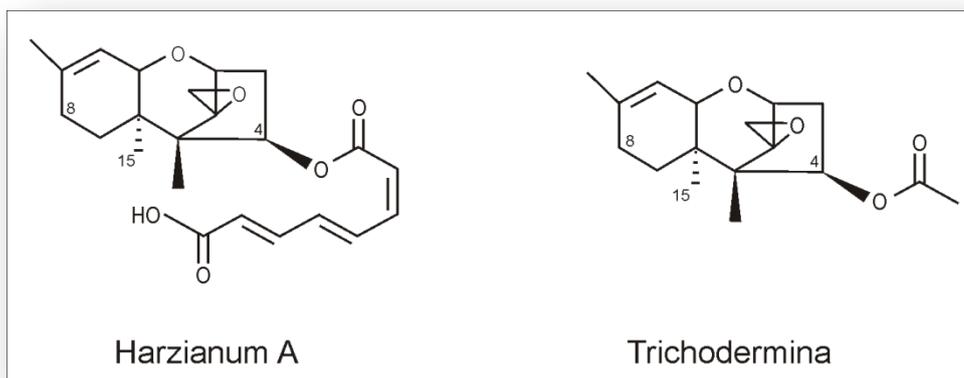


Figura 23. Trichotecenos producidos por el género *Trichoderma*.

Degenkolb y colaboradores sugirieron en 2008 la posibilidad de que el harzianum A sea “el eslabón perdido” entre los trichotecenos simples y los macrocíclicos, mucho más tóxicos que los primeros, ya que la ausencia de un grupo hidroxilo en C-15 podría permitir la unión a ese punto del ácido (2Z,4E,6E)-octa-2,4,6-trienedioico u otro compuesto relacionado, generando así un anillo macrocíclico característico de los trichotecenos de clase D.

OBJETIVOS

- ✎ Clonar los genes implicados en la ruta de biosíntesis del HA en *T. arundinaceum* IBT 40837.
- ✎ Caracterizar la ruta biosintética del HA mediante la expresión heteróloga de los genes que participan en esta ruta.
- ✎ Desarrollar un método de purificación del HA a partir de caldos de cultivo del hongo productor *T. arundinaceum* IBT 40837.
- ✎ Desarrollar un método de análisis del HA mediante HPLC.

RESULTADOS

1. Clonación del *cluster* de biosíntesis del harzianum A.

El primer objetivo que se abordó al inicio de esta Tesis Doctoral fue la clonación de todos los genes implicados en la ruta de biosíntesis del HA en Ta37. En el momento de comenzar el trabajo se habían descrito los *clusters* de biosíntesis de los trichotecenos toxina T-2 en *F. sporotrichioides* (Brown *et al.*, 2004) y DON en *F. graminearum* (Kimura *et al.*, 2003), además de la existencia de los genes *TRI4*, *TRI5* y *TRI6* en *M. roridum* (Trapp *et al.*, 1998). La estrategia seguida consistió en la obtención de sondas de genes *tri* ya descritos en otras especies y su hibridación con la genoteca de Ta37. Una vez detectados algunos de los genes, se secuenciaron las zonas adyacentes a cada uno de ellos mediante el método de *genome walking*, basándonos en que la bibliografía disponible indicaba una agrupación de este tipo de genes.

Nomenclatura genética: en *Fusarium* y *Myrothecium*, los genes se escriben en cursiva con 3 letras mayúsculas seguidas de un número (*TRI4*), sin embargo, para seguir la nomenclatura establecida para *Trichoderma*, en esta memoria los genes pertenecientes a este género se nombrarán en cursiva con 3 letras minúsculas seguidas de un número (*tri4*). En todos los casos, para las proteínas se emplean 3 letras, la primera en mayúscula, seguidas de un número (Tri4).

1.1. Obtención de las sondas de los genes *tri4* y *tri6*.

El primer paso consistió en seleccionar los genes *tri* con los que se hibridaría la genoteca de Ta37. Debido a que no se conocía la homología entre los genes de *F. sporotrichioides* o *M. roridum* con sus ortólogos de Ta37, se obtuvieron sondas a partir de ambos microorganismos con el fin de aumentar las posibilidades de obtener una hibridación positiva con el ADN de Ta37. Se seleccionaron los genes *tri4* y *tri6* debido a que en los *clusters* de *Fusarium* y *Myrothecium* se encuentran en una posición central, lo cual facilitaría la detección de algún clon de la genoteca de Ta37 que contuviera más de un gen *tri* (en el supuesto de que en la cepa Ta37 los genes *tri* se encontraran agrupados). Con respecto al

gen *tri5*, aparte de que ocupa una posición central en los *clusters* anteriormente mencionados, había sido clonado en la especie *T. harzianum* (Gallo et al., 2004), lo cual podría facilitar el diseño de oligonucleótidos que permitieran amplificar el gen en Ta37 debido a su mayor proximidad filogenética.

Basándose en las secuencias depositadas en el GenBank de los genes *TRI4* y *TRI6* de *F. sporotrichioides* y *M. roridum*, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 6) para amplificar ambos genes mediante PCR. Se intentó poner a punto un protocolo de PCR para amplificar dichos genes utilizando como molde el ADN total de Ta37, no obteniéndose una banda de amplificación así que se optó por utilizar estos pares de oligonucleótidos para obtener sondas heterólogas con las que localizar sus ortólogos en Ta37 mediante hibridación.

Especie	Sonda	Gen	Oligonucleótidos	Tamaño
<i>F. sporotrichioides</i>	Tri4Fs	<i>FsTRI4</i>	Tri4A37 / Tri4A38	1.761 pb
<i>F. sporotrichioides</i>	Tri6Fs	<i>FsTRI6</i>	Tri6-292 / Tri6-293	670 pb
<i>M. roridum</i>	Tri4Mr	<i>MrTRI4</i>	Mr4BN / Mr4BC	1.438 pb
<i>M. roridum</i>	Tri6Mr	<i>MrTRI6</i>	Tri6NT / Tri6CT	1.178 pb

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la obtención de las sondas Tri4Fs, Tri6Fs, Tri4Mr y Tri6Mr. Se indica el tamaño de la sonda.

Tras obtener el ADN total de *F. sporotrichioides* y *M. roridum*, se puso a punto un protocolo de PCR para amplificar los 2 genes en ambas especies utilizando la *Pfu* polimerasa. Una vez que se obtuvieron fragmentos de amplificación únicos y del tamaño esperado, éstos se purificaron a partir de gel de agarosa (ver materiales y métodos 7.2.6.1) y se clonaron en el plásmido pCR[®]II-TOPO[®] (Invitrogen; Carlsbad, CA). Mediante secuenciación se comprobó que esos fragmentos correspondían con los genes *tri4* y *tri6* de *F. sporotrichioides* y *M. roridum*. Para obtener las sondas, se repitieron las PCRs anteriores a gran escala (150 µl de volumen final), los fragmentos resultantes se purificaron de gel y se marcaron con DIG (ver materiales y métodos 7.2.10.2).

1.2. Obtención de la sonda del gen *tri5*.

En el caso del gen *tri5*, la estrategia a seguir fue diferente ya que este gen había sido clonado previamente en *T. harzianum* (Gallo *et al.*, 2004), esperándose una alta homología entre este gen y su ortólogo de Ta37. Por ello, se empleó el par de oligonucleótidos Tri5F y Tri5R (diseñados por el equipo de Gallo en 2004) que amplificaban un fragmento interno del gen *tri5* de 0,5 Kb en dicha especie.

Tras poner a punto las condiciones de PCR utilizando la *Pfu* polimerasa, se obtuvo un fragmento único de 0,5 Kb utilizando como molde el ADN total de Ta37. Al igual que con los genes *tri4* y *tri6*, se subclonó en pCR[®]II-TOPO[®] (Invitrogen; Carlsbad, CA) y se secuenció, comprobándose que se trataba del gen *tri5*. Se repitió de nuevo la PCR a gran escala para purificar y marcar el fragmento con DIG (sonda Tri5Ta).

1.3. Puesta a punto de las condiciones de hibridación.

Debido a la dificultad añadida que supone la hibridación de una genoteca con una sonda heteróloga por falta de complementariedad completa entre las secuencias de nucleótidos, se hizo necesaria la puesta a punto de las condiciones en las que se llevaría a cabo dicha hibridación. Para ello se diseñaron experimentos de “prueba” utilizando ADN total de varias cepas de *Trichoderma*, de *F. sporotrichioides* y de *M. roridum* y las sondas de los genes *tri4* y *tri6*, bajo diferentes condiciones de astringencia (que se consiguieron variando el porcentaje de formamida en el tampón de hibridación).

El ADN total de las cepas fúngicas fue digerido con *Bam*HI durante 6 h, fenolizado, precipitado y vuelto a digerir al día siguiente para conseguir su digestión total. La misma cantidad de las muestras limpias y perfectamente digeridas se corrieron en un gel del 0,75% de agarosa y se transfirieron por capilaridad a un filtro de nylon (ver materiales y métodos 7.2.10). Este filtro fue reutilizado varias veces para ser hibridado con diferentes sondas y bajo distintas condiciones, las cuales se resumen a continuación (Fig. 24):

- **Sonda Tri6Mr:** se hibridó utilizando un tampón con un 30% y un 40% de formamida, durante 16 h a 42°C. Se obtuvo como resultado que el ADN de *M. roridum* daba una banda de hibridación muy clara, nítida e intensa de 6,5 Kb aproximadamente en los dos tampones de hibridación. Además, en los dos tampones (aunque con mayor intensidad en el del 30% de formamida) se

observó una banda de hibridación de aproximadamente 7 Kb en las cepas *T. arundinaceum* ATCC 90237 y Ta37, y una de aproximadamente 20 Kb en la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841. Los ADNs totales de *F. sporotrichioides* y de T34 no dieron ninguna banda de hibridación.

- **Sonda Tri6Fs:** se hibridó utilizando un tampón con un 30% y un 40% de formamida, durante 16 h a 42°C. Como era de esperar, el ADN de *F. sporotrichioides* dio una banda de hibridación muy clara de 4,1 Kb, en ambas condiciones, sin embargo ninguno de los otros ADNs dio una banda positiva de hibridación.
- **Sonda Tri4Mr:** se hibridó empleando un tampón con un 25% de formamida durante 16 h a 42°C. Se obtuvo una banda positiva muy clara de 9 Kb en el ADN de *M. roridum*, y otras muy tenues en *F. sporotrichioides* (3,8 Kb), *T. brevicompactum* IBT 40841 (20 Kb) y *T. arundinaceum* ATCC 90237 y Ta37 (2,9 Kb). El ADN de T34 no dio ninguna banda positiva.

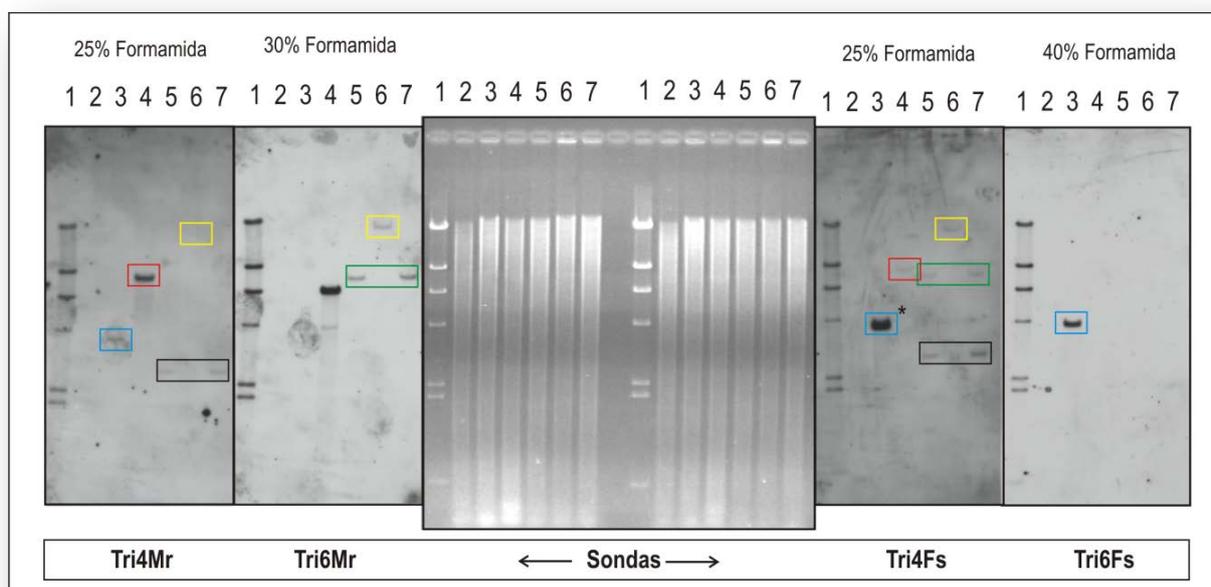


Figura 24. Hibridación tipo Southern de ADNs totales de diversos hongos digeridos con *Bam*HI, con sondas correspondientes a los genes *TRI4* y *TRI6* de *F. sporotrichioides* y *M. roridum*. La concentración de formamida empleada en cada experimento se indica en la parte superior de cada panel. Carril 1: *NHind*III, carril 2: *T. harzianum* CECT 2413 (T34), carril 3: *F. sporotrichioides* ATCC 24630; carril 4: *M. roridum* ATCC 52485, carril 5: *T. arundinaceum* ATCC 90237, carril 6: *T. brevicompactum* IBT 40841 y carril 7: *T. arundinaceum* IBT 40837. Las bandas de hibridación del mismo tamaño entre paneles diferentes se indican en rectángulos del mismo color. El asterisco indica una banda doble que coincide con la secuencia depositada en la base de datos.

- **Sonda Tri4Fs:** se hibridó empleando un tampón con un 25% de formamida durante 16 h a 42°C. Como resultado se obtuvo una banda clara y nítida en el ADN de *F. sporotrichioides* (resultando ser doble: 3,8 y 4,1 Kb; dato que coincidía con los tamaños esperados según la secuencia depositada en la base de datos) y bandas muy tenues en *M. roridum* (9 Kb), *T. brevicompactum* IBT 40841 (20 Kb) y dos bandas muy débiles en *T. arundinaceum* ATCC 90237 y Ta37 (2,9 y 7 Kb). El ADN de T34 no dio ninguna banda positiva.

Estos resultados indicaron que 1) las mejores condiciones para llevar a cabo la hibridación consisten en utilizar la sonda del gen *TRI4* en un tampón de hibridación con 25% de formamida; 2) los genes *TRI4* y *TRI6* no tienen una alta homología entre *F. sporotrichioides* y *M. roridum* como indican las bandas tenues obtenidas al hibridar su ADN con la sonda obtenida a partir del otro hongo; 3) la localización de los 2 genes en las 2 cepas de *T. arundinaceum* es idéntica (o muy similar), ya que en ambos casos siempre se obtienen bandas positivas del mismo tamaño, hecho que podría ser debido a su cercanía filogenética; 4) la hibridación de ambos genes da las mismas bandas positivas, poniendo de manifiesto la proximidad física entre ambos genes y la posibilidad de la existencia de un *cluster* de genes *tri* tanto en *T. brevicompactum* como en las 2 cepas de *T. arundinaceum* y 5) en la cepa T34 no existen ninguno de los 2 genes *tri* (dato esperado ya que es una cepa que no produce trichotecenos).

1.4. Hibridación de las sondas de los genes *tri* con la genoteca de Ta37.

Con el fin de aumentar las posibilidades de obtención de un clon positivo, se hibridó la genoteca de Ta37 con una mezcla de las sondas Tri4Fs y Tri4Mr en un tampón de hibridación con un 25% de formamida. En la búsqueda en la librería genómica de Ta37 se identificaron tres clones que hibridaban con el gen *tri4* (F41, F42 y F44; Fig. 25). Mediante secuenciación parcial de las secuencias de dichos clones y su posterior comparación con las bases de datos (BLAST) se determinó que contenían los genes *tri4*, *tri6* y *tri12*. Un subclón del F44 (que contenía el gen *tri12*) fue utilizado como sonda para hibridar de nuevo la genoteca de Ta37, consiguiendo de este modo otros 2 clones (F51 y F52) solapantes con el F44.

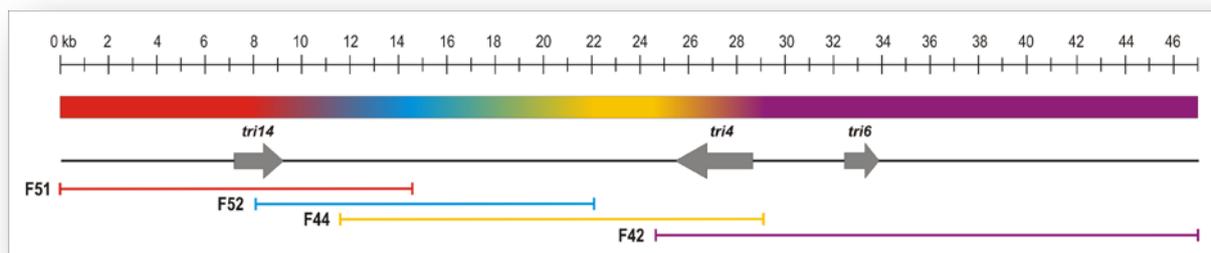


Figura 25. Mapa de solapamiento de los fagos empleados para secuenciar el *cluster* del HA en la cepa Ta37. Se muestra la localización de los genes *tri* que flanquean el *cluster* y el gen *tri4*.

El análisis de la secuencia de 46,7 Kb correspondiente a la región conformada por los clones F42, F44, F51 y F52 reveló la presencia de 7 ortólogos de los genes *TRI* de *F. sporotrichioides* y *M. roridum*, cuyo orden era: *tri14*, *tri12*, *tri11*, *tri10*, *tri3*, *tri4* y *tri6*, quedando de este modo demostrada la existencia de un *cluster* de genes de biosíntesis de HA en Ta37. Adicionalmente a los genes *tri*, en la región adyacente al gen *tri14* se identificaron 2 ORFs, denominados *orfA* y *orfB*, y otros 2 en la región flanqueante del gen *tri6*, el *orfC* y el *orfD*. La secuencia de aminoácidos de estos ORFs presentaba unos elevados niveles de similitud (BLAST) con una superfamilia de metalo- β -lactamasas (*orfA*), con α -N-acetilglucosaminidasas (*orfB*), con proteínas de función desconocida (*orfC*) y con proteínas de transporte de oligopéptidos (*orfD*) (Fig. 26).

Paralelamente, se hibridó la genoteca de Ta37 con la sonda Tri5Ta en un tampón de hibridación con 50% formamida, obteniéndose 2 clones solapantes, el F72 y el F73, que contenían la región codificante completa del gen *tri5*. Sin embargo, tras el análisis de la secuencia de 18 Kb contenida en estos 2 clones, no se identificaron nuevos ortólogos de los genes *tri*.

Basándose en los datos obtenidos, se sugiere que la región de ADN genómico de 24.291 pb comprendida entre los genes *tri14* y *tri6* constituye el *cluster* principal de biosíntesis del HA en Ta37 y que el gen *tri5* se encuentra aislado en otra región genómica.

Empleando las secuencias de los genes *tri* de Ta37, se diseñaron oligonucleótidos (ver anexo 1) para amplificar y secuenciar sus correspondientes ortólogos en la otra especie productora de trichotecenos dentro del género *Trichoderma*: *T. brevicompactum* IBT 40841. De este modo se describió la presencia en esta cepa de los 8 genes *tri* identificados en Ta37, presentando una homología de secuencia $\geq 92\%$ con sus ortólogos de Ta37 (Tabla 7), y cuya organización y orientación era idéntica a la descrita en Ta37.

Ta37	% identidad		
	<i>T.brevicompactum</i>	<i>M.roridum</i>	<i>F.sporotrichioides</i>
tri3	92	-	48
tri4	98	67	73
tri5	99	56	57
tri6	99	51	46
tri10	98	-	58
tri11	96	-	38
tri12	92	-	55
tri14	99	-	64

Tabla 7. Comparación de las secuencias de aminoácidos de los ortólogos *tri* de Ta37 con otros hongos. Nótese que en la especie *M. roridum* sólo están descritos los genes *tri4*, *tri5* y *tri6*.

La principal diferencia entre los *clusters* de las 2 cepas de *Trichoderma* consiste en que la región que ocupa dicho cluster en *T. brevicompactum* es más amplia que en *T. arundinaceum* (25.498 pb frente a 24.291 pb) debido a que la región intergénica comprendida entre *tri12* y *tri11* es mayor en la primera cepa (3.000 pb) que en la segunda (1.793 pb). Esta organización común en las cepas de *Trichoderma* difiere mucho con la organización de los genes *TRI* en *Fusarium*. Solamente 7 genes aparecen en el *cluster* de *Trichoderma* mientras que en *F. sporotrichioides* el *cluster* está constituido por 14 genes (Brown *et al.*, 2004) y en *F. graminearum* está formado por 10 (Kimura *et al.*, 2003) (Fig. 26). Aunque la organización de los genes es muy diferente entre ambos géneros, el *cluster* de *Trichoderma* puede dividirse en 2 regiones o bloques cuyos genes presentan un orden relativo conservado con respecto a los mismos bloques del *cluster* de *Fusarium*: existe una región ortóloga al bloque formado por los genes *tri3-tri4-tri6* de *Trichoderma* en el *cluster* de *Fusarium* y lo mismo ocurre con el bloque formado por los genes *tri14-tri12-tri11-tri10*, excepto por el hecho de que en *Fusarium* aparece el gen *TRI9* entre los genes *TRI10* y *TRI11* y en *F. sporotrichioides* se añade además el gen *TRI13* entre los genes *TRI12* y *TRI14*. Otro hecho que se constató fue que la orientación de los genes dentro de los bloques es básicamente la misma entre *Trichoderma* y *Fusarium*, los únicos que difieren son los genes *tri3* y *tri4*.

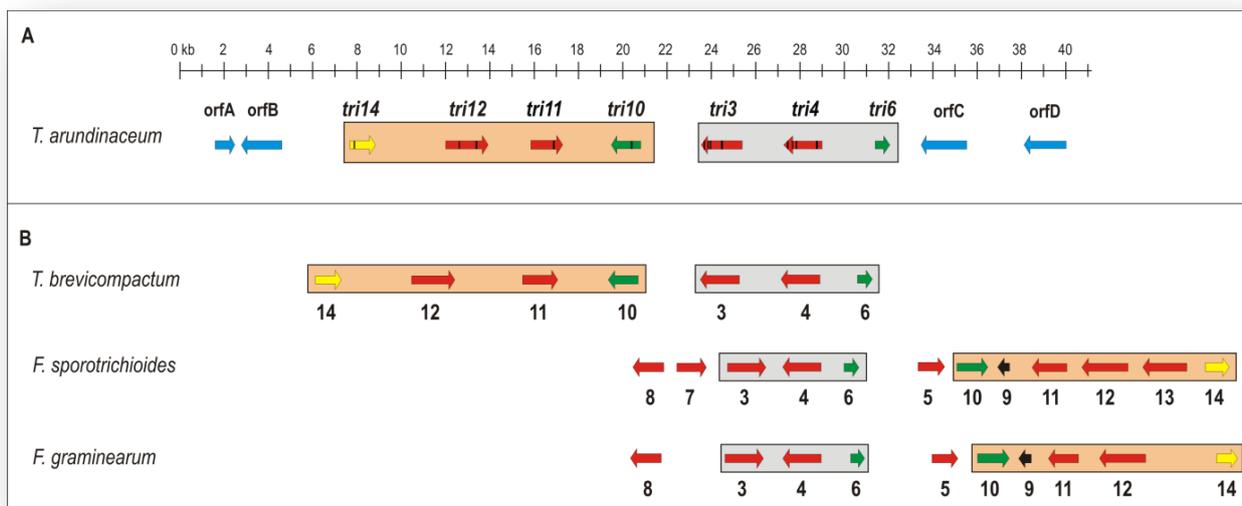


Figura 26. Cluster de biosíntesis de trichotecenos en *Trichoderma* y *Fusarium*. A) Organización genómica del *cluster* principal de genes *tri* en Ta37. Las flechas indican la posición y la dirección de la transcripción de cada uno de los genes y los pequeños rectángulos negros en su interior representan los intrones de cada ORF. Los nombres sobre cada flecha corresponden a la denominación de sus ortólogos en *Fusarium*. El color de las flechas indica la función de los genes: las rojas representan a los genes estructurales implicados en la biosíntesis (*tri11*, *tri3* y *tri4*) o transporte al exterior de la célula (*tri12*) del HA; las verdes indican genes con función reguladora (*tri6* y *tri10*); la amarilla se refiere a un gen con función desconocida (*tri14*) y las flechas azules señalan los ORFs no correspondientes a genes *tri*. Nótese que el gen *tri5* no ha sido representado por no hallarse dentro del *cluster* en Ta37. B) Comparación de la organización genómica del *cluster* principal de genes *tri* entre Ta37 y las especies *T. brevicompactum*, *F. sporotrichioides* y *F. graminearum*. Los números sobre las flechas indican su nombre basado en los ortólogos de *Fusarium*. Al igual que en A, las flechas indican la posición y dirección de los genes y su color representa la función de cada gen (se incluye una flecha negra para el gen *TRI9* por desconocerse su función y estar ausente en el *cluster* de *Trichoderma*). Los rectángulos que agrupan varios genes representan a los diferentes bloques dentro del *cluster*, cuya organización es similar en las especies incluidas en el esquema.

2. Caracterización de los genes y proteínas Tri de Ta37.

2.1. Caracterización de los genes *tri* de Ta37.

A la hora de caracterizar cada uno de los genes *tri* de Ta37 (Tabla 8), se comparó cada una de las secuencias obtenidas con la base de datos no redundante (*nr* database) empleando el algoritmo BLASTX con el fin de averiguar la posible función de cada gen y el porcentaje de similitud con sus ortólogos de otras especies de hongos. Adicionalmente, se obtuvo el ADNc de cada uno de los genes implicados en la biosíntesis de HA y se secuenció con el fin de determinar y delimitar los intrones presentes (si los hubiera) en cada uno de ellos.

Gen	Longitud (pb)	Longitud intrones (pb)	Nº aa	Masa molecular ¹	pI	Función ²
<i>tri3</i>	1.785	57/55/56/54	520	58,6	5,8	Acetiltransferasa
<i>tri4</i>	1.791	70/58/56/53	517	58	7,9	P450 monooxigenasa
<i>tri5</i>	1.226	59	338	44,9	4,94	Trichodieno sintasa
<i>tri6</i>	657	-	219	25,04	5,96	Factor transcripción
<i>tri10</i>	1.339	70	422	47,6	5,8	Factor transcripción
<i>tri11</i>	1.580	80	499	57,3	8,1	P450 monooxigenasa
<i>tri12</i>	1.932	55/68	602	65,5	6,25	Transportador trichotecenos
<i>tri14</i>	1.151	59	363	39,9	4,47	?

Tabla 8. Caracterización de los genes *tri* de Ta37. Abreviaturas: aa- aminoácidos; pb- pares de bases; pI- punto isoeléctrico.¹ Masa molecular, en kDa, deducida de la secuencia de aminoácidos.
² Función hipotética deducida por comparación utilizando el algoritmo BLASTX.

2.2. Caracterización *in silico* de las proteínas Tri de Ta37.

Mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de cada una de las secuencias de los genes *tri* de Ta37 con las proteínas homólogas de otras especies de hongos, se determinaron las regiones y residuos importantes para que cada proteína pudiera ejercer su función.

- **Tri3.** Pertenece muy probablemente a la familia de las cloranfenicol acetiltransferasas (CAT) ya que contiene la secuencia consenso HXXXDG (HLFWDG) entre las posiciones 188 y 193 (Murray y Shaw, 1997), pero no la secuencia DFGWGKP en el extremo 3' (Alexander *et al.*, 2002).
- **Tri4 y Tri11.** Ambas proteínas fueron identificadas como citocromo P450 monooxigenasas y contienen todas las características estructurales conservadas descritas para esta familia de proteínas. En el centro de la proteína, en las proximidades del grupo hemo, es donde se encuentran las estructuras más conservadas que confieren a la enzima la capacidad de transferir protones y electrones y de activar el oxígeno molecular (Alexander *et al.*, 1998; Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Esta región comprende:
 - Un lazo de unión al grupo hemo formado por la secuencia consenso FXXGXRXCXG (siendo la cisteína la que funciona como el quinto ligando

del hierro del grupo hemo) que consiste en los aminoácidos FSQGSRQCIG (en las posiciones 445 a 454) en Tri4 y en FNVGPRNCVG (entre las posiciones 435 y 444) en Tri11.

- El motivo conservado EXXR, posiblemente necesario para mantener la estabilidad de la estructura, estando formado por EGLR en Tri4 (posiciones 369-372) y EAFR en Tri11 (posiciones 352-355).
- Una zona central que contiene la secuencia consenso (A/G)GX(D/E)T(T/S) (que pertenece al surco de transferencia de la proteína) considerada como la marca de las P450 monooxigenasas, correspondiendo a los aminoácidos AGTETT (en las posiciones de 311 a 316) en Tri4 y AGSETT (entre las posiciones 294 y 299) en Tri11.

A pesar de la elevada conservación de los motivos consenso entre las proteínas de la familia de las P450 monooxigenasas, las proteínas Tri4 y Tri11 de Ta37 presentan una similitud muy baja (19%) entre ellas.

- **Tri5.** El análisis de la secuencia de la proteína mostró 2 motivos conservados de unión a metales que coordinan la unión del FPP a través de puentes en los que participa el ión Mg^{2+} , lo cual es similar a otras proteínas pertenecientes a la clase 1 de *cis-trans* terpeno ciclasas que catalizan la ciclación del FPP para dar lugar al trichodieno. El primer motivo coincide con la secuencia consenso DDXX, que se corresponde con DDSR en Tri5 (aminoácidos 109-112). La primera D se coordina con la segunda región conservada (N/D)XXX(S/T)XXE que se corresponde con los aminoácidos 234-242 (NDLFSFYKE) de Tri5.
- **Tri6.** El análisis de la secuencia de la proteína Tri6 reveló la presencia de 3 regiones en el extremo C-terminal similares a dominios de dedos de zinc, importantes para la unión al ADN, característicos de un amplio rango de proteínas implicadas en regulación génica. El motivo ZF1 comparte una alta similitud con la secuencia consenso $(\psi/Y)XCX_{2,4}CX_3FX_5\psi X_2HX_{3,5}H$ (ψ representa cualquier aminoácido hidrófobo) (Berg y Godwin, 1997) típica de las proteínas de unión a ADN mediante motivos de dedos de zinc, siendo además muy similar al motivo ZF1 de la proteína Tri6 de *F. sporotrichioides* y *M. roridum* (Fig. 27.A). Los motivos ZF2 y ZF3 contienen los residuos CCFHH de la secuencia consenso, pero también otros aminoácidos adicionales, lo que les

confiere en conjunto una alta similitud con los mismos motivos de la proteína Tri6 de las otras 2 especies de hongos. Al comparar el extremo C-terminal de la proteína de Ta37 con el de las proteínas de *F. sporotrichioides* y *M. roridum*, la similitud es de un 73% y un 84% respectivamente, aunque si la comparación se lleva a cabo con la secuencia completa, esa homología es solamente de un 47% y un 51% respectivamente.

En *Fusarium*, la proteína Tri6 induce la expresión del resto de genes del *cluster*, en parte gracias a su unión a la secuencia de ADN formada por los nucleótidos YNAGGCC presente en la región promotora de dichos genes (Hohn *et al.*, 1999). La misma secuencia se ha encontrado en los promotores de los genes *tri* de Ta37 (Fig. 27.B) por lo que se deduce que la proteína Tri6 en Ta37 se une a las secuencias promotoras de los genes del *cluster* de genes *tri* regulando su expresión de un modo análogo al descrito en *Fusarium* (Hohn *et al.*, 1999).

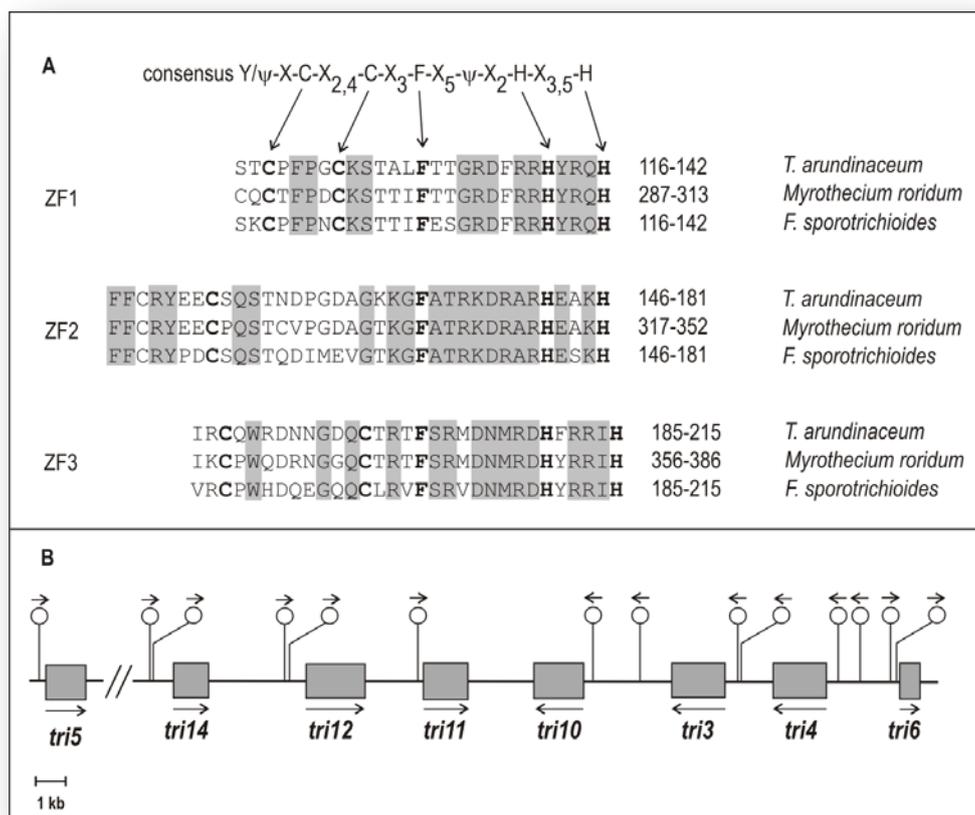


Figura 27. Estudio sobre la proteína Tri6. A) Alineamiento de las secuencias de los dominios ZF1, ZF2 y ZF3 (dedos de zinc) del extremo C-terminal de la proteína Tri6 de Ta37, *M. roridum* y *F. sporotrichioides*. En negrita se indican los residuos de las secuencias consenso de los dominios de dedos de zinc. Los aminoácidos conservados en las 3 proteínas se muestran sombreados. B) Localización de las hipotéticas secuencias de unión para el factor de transcripción Tri6 en las regiones promotoras del resto de los genes *tri* de Ta37.

- **Tri10.** Empleando los algoritmos BLASTP, CDART y CDD (*Conserved Domain Database*) para el análisis de los 422 aminoácidos de la proteína Tri10 no se detectó ningún dominio transmembrana. Además, el programa MotifFinder no encontró ningún dominio conservado. Sin embargo, empleando otros algoritmos como DAS (*Dense Alignment Surface*), TMpred (*TransMembrane Prediction*), SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) y TMHMM (*transmembrane helices*) se detectó una hipotética región transmembrana entre los aminoácidos 196 y 218. Comparando las secuencias de las proteínas Tri10 de Ta37 y *F. sporotrichioides*, se obtuvo una similitud del 58%.
- **Tri12.** El estudio de su secuencia de aminoácidos reveló una alta similitud con la proteína Tri12 de *Fusarium*, cuya función es la de servir como un transportador de trichotecenos al exterior celular (Alexander *et al.*, 1999). Ambas proteínas mostraron una elevada similitud con las proteínas MFS (*Major Facilitator Superfamily*) lo cual indica que probablemente participan en el transporte de trichotecenos a través de la membrana citoplasmática y otras membranas intracelulares. Mediante la utilización del programa PROTEAN (Hopp y Woods, 1981) se predijo que la proteína Tri12 de Ta37 contenía 14 dominios transmembrana α -hélice conectados por grupos hidrofílicos. Esta estructura es coherente con la presencia de 272 aminoácidos hidrófobos, el 45% de los residuos totales de la proteína, un porcentaje similar al que presenta la proteína Tri12 de *F. sporotrichioides* (44%) y mayor al del resto de las proteínas Tri de Ta37.
- **Tri14.** Al igual que en las proteínas Tri14 de *Fusarium*, no se han encontrado dominios conservados en la secuencia de aminoácidos de esta proteína y su función sigue sin ser determinada.

2.3. Caracterización funcional de los genes *tri4*, *tri5* y *tri11* de Ta37.

El análisis funcional de varios de los genes *tri* implicados en la biosíntesis de HA en Ta37 fue llevado a cabo mediante la expresión heteróloga de dichos genes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* INVSc y la posterior realización de experimentos de “*feeding*” con los transformantes obtenidos (ver apartados 9.3 y 13 de materiales y métodos).

2.3.1. Caracterización funcional del gen *tri5*.

Una vez que se construyó el plásmido pYeTri5 (apartado 2.3 de materiales y métodos), éste se transformó en la levadura *S. cerevisiae* INVSc1. Tras la selección por complementación de auxotrofia de uracilo y posterior análisis genético de las colonias resultantes, se obtuvieron 4 clones transformados con el gen *tri5* de Ta37.

En este caso no fue necesario la realización de experimentos de *feeding* ya que el precursor de la supuesta actividad de la proteína codificada por el gen *tri5* es el FPP, metabolito clave en la ruta de biosíntesis de terpenos y, por lo tanto, sintetizado de forma natural por la propia levadura.

Tras el cultivo de estos 4 transformantes en medio rico en galactosa, se analizó el sobrenadante mediante GC-MS revelando la presencia de trichodieno, primer intermediario de la ruta específica de biosíntesis de trichotecenos (Fig. 28). Estos resultados indicaban que la enzima Tri5 catalizaba la ciclación del FPP para dar lugar al trichodieno, reacción idéntica a la descrita para la enzima Tri5 de *Fusarium*.

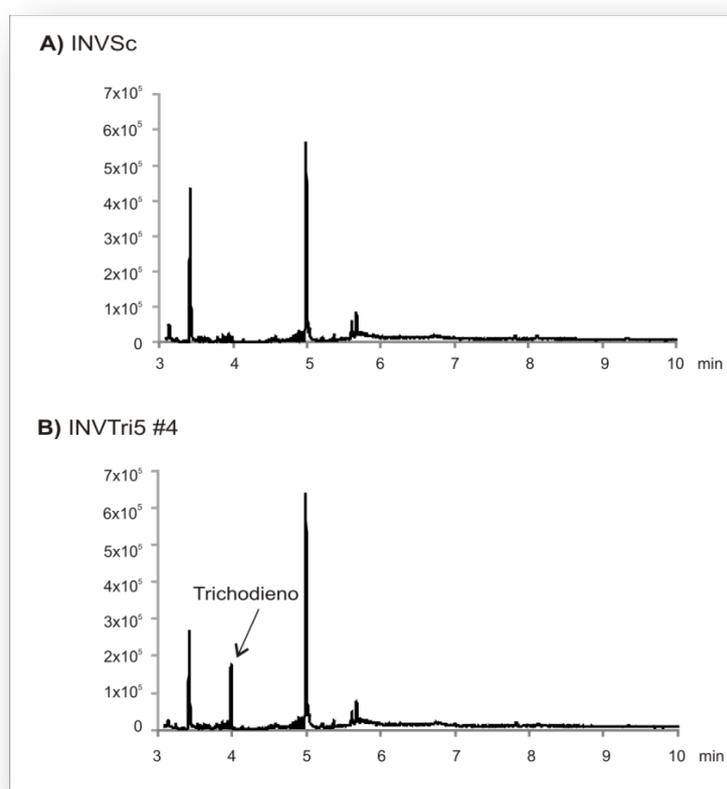


Figura 28. Cromatogramas de extractos de cultivos de 4 días en medio rico en galactosa de *S. cerevisiae*, obtenidos mediante GC-MS. A) Cepa silvestre INVSc. B) Cepa transformante INVtri5#4. La flecha muestra el pico de trichodieno a los 4 min.

2.3.2. Caracterización funcional del gen *tri4*.

Tras la transformación de *S. cerevisiae* con el plásmido pYETri4 se seleccionaron 8 transformantes que contenían en gen *tri4* de Ta37. Para el estudio de la función de la enzima Tri4 de Ta37, se cultivaron estas cepas en medio rico en galactosa suplementado con 0,1 mg/ml de trichodieno (TD), el sustrato de la enzima Tri4 en *Fusarium* y *Myrothecium*. El análisis de extractos obtenidos a partir de estos cultivos indicó la presencia del intermediario isotrichodiol (Fig. 29.1). Basándose en estos resultados, la enzima Tri4 de Ta37 catalizaba 3 pasos de hidroxilación consecutivos del trichodieno para dar lugar al isotrichodiol.

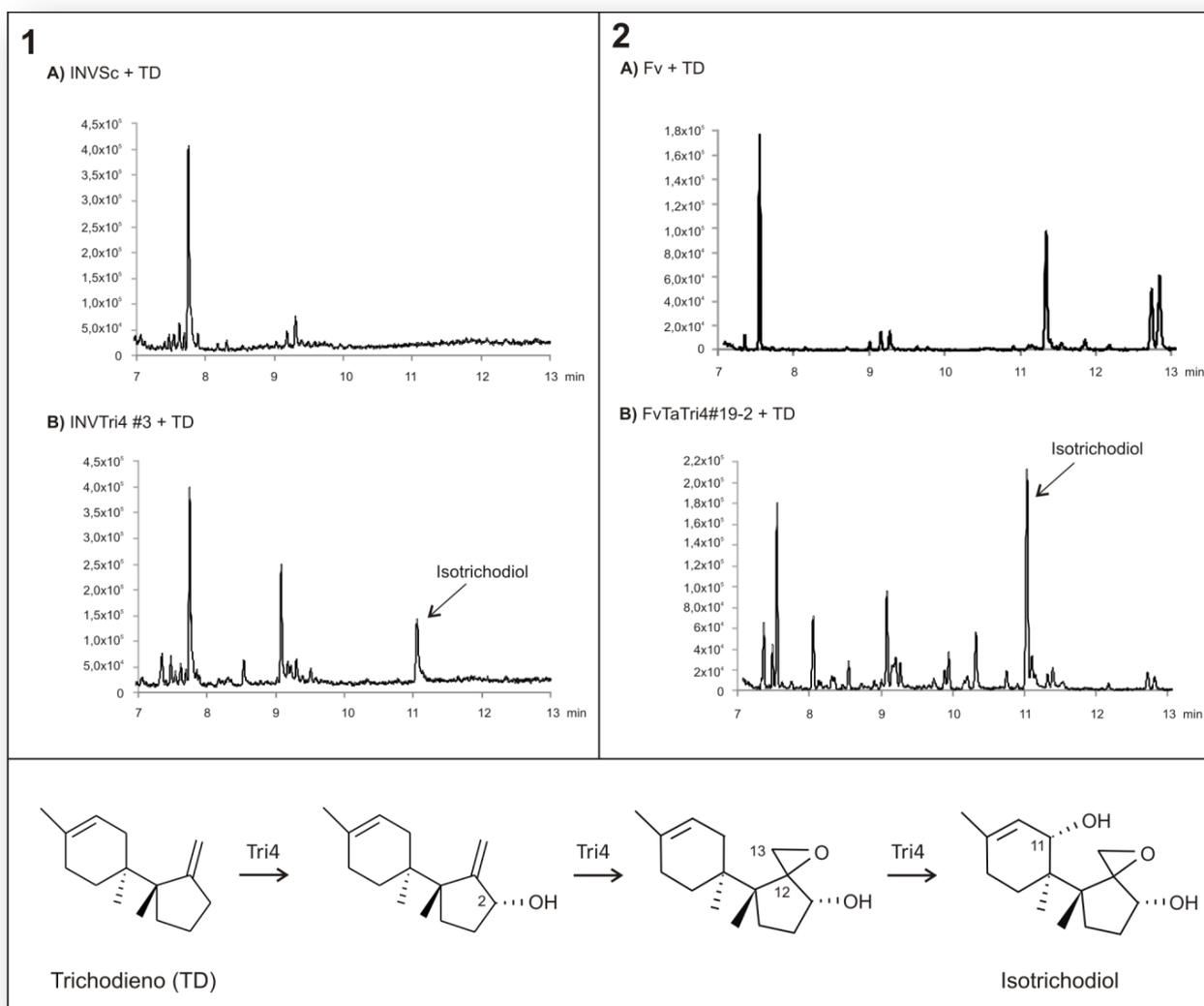


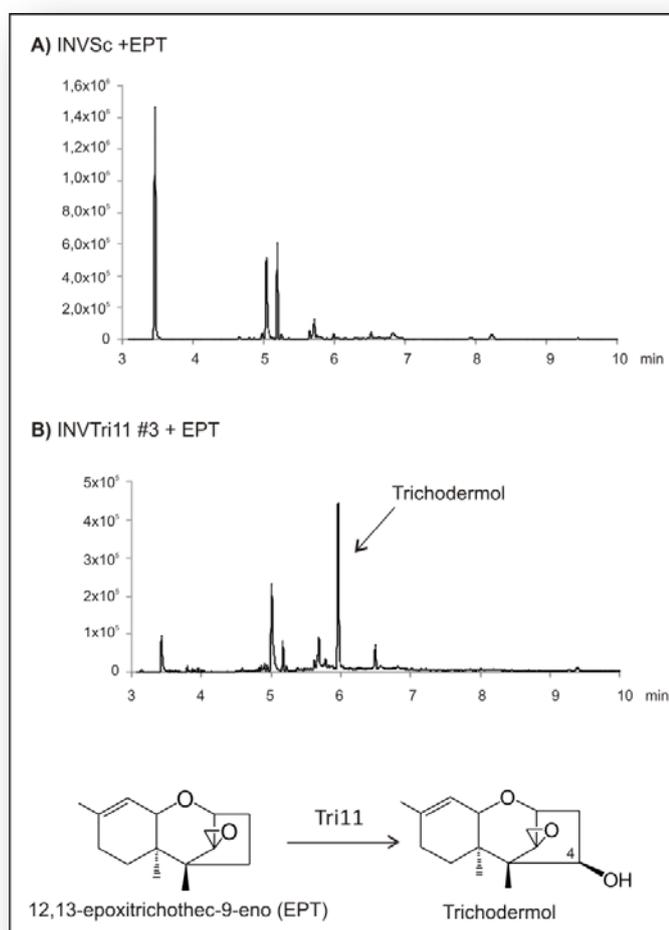
Figura 29. Cromatogramas obtenidos mediante GC-MS. 1) Extractos de cultivos de 3 días de *S. cerevisiae* INVSc (A) e INVTri4#3 (B) en medio rico en galactosa + trichodieno. 2) Extractos de cultivos de 4 días de *F. verticillioides* (A) y un transformante de *F. verticillioides* que expresa el gen *tri4* de Ta37 (FvTaTri4#19-2) (B) en medio 5-GYEP + trichodieno. La flecha indica la posición del isotrichodiol a los 11,1 min. Se ilustran las reacciones llevadas a cabo por la enzima Tri4 de Ta37.

La función de esta enzima fue también comprobada introduciendo el casete de expresión del gen *tri4* de Ta37 (presente en el plásmido pSPT4-4) en el hongo *F. verticillioides*, cepa no productora de trichotecenos. La adición de trichodieno a cultivos de los 8 transformantes de *F. verticillioides* conteniendo el gen *tri4* de Ta37 dio como resultado la producción de isotrichodiol (Fig. 29.2), al igual que en los experimentos hechos con *S. cerevisiae*.

2.3.3. Caracterización funcional del gen *tri11*.

Cinco transformantes de la levadura *S. cerevisiae* que expresaban el gen *tri11* de Ta37 (contenido en el plásmido pYETri11) fueron seleccionados para llevar a cabo experimentos de *feeding*. Tras cultivar las levaduras en medio rico en galactosa suplementado con 250 μ M de 12,13-epoxitrichotec-9-eno (EPT) durante 3 días, se extrajo su sobrenadante y se analizó mediante GC-MS, detectándose 4-hidroxitrichoteceno (trichodermol) (Fig.30). De este modo se confirmó que la actividad enzimática de la proteína Tri11 en Ta37 consistía en la hidroxilación en posición C-4 del EPT, actividad diferente a la llevada a cabo por la proteína Tri11 en *Fusarium* que no hidroxila en C-4 sino en C-11.

Figura 30. Cromatogramas de extractos de cultivos de 3 días de *S. cerevisiae* en medio rico en galactosa + EPT, obtenidos mediante GC-MS. A) Cepa silvestre INVSc. B) Cepa transformante INVtri11#3. La flecha muestra el pico de trichodermol a los 6 min. Se ilustra la reacción llevada a cabo por la enzima Tri11 de Ta37.



3. Estudio de la expresión de los genes implicados en la síntesis del HA en Ta37.

El ARN de la cepa Ta37 se extrajo a partir de cultivos crecidos en PDBs recogidos cada 24 h, desde las 24 hasta las 96 h, para sintetizar su correspondiente ADNc, que serviría de molde en experimentos de qPCR empleando oligonucleótidos específicos para cada gen *tri* de Ta37 (anexo 1). Estos resultados pusieron de manifiesto un patrón común en la expresión a lo largo del tiempo de los genes de biosíntesis del HA. Así, el máximo nivel de expresión de los genes estructurales (*tri3*, *tri4*, *tri5* y *tri11*) y del gen *tri12* se obtiene a las 48h de cultivo y va disminuyendo en las siguientes horas (Fig. 31). Sin embargo, el patrón de expresión de los genes reguladores *tri6* y *tri10* es marcadamente diferente, alcanzándose su máximo nivel a las 24h de cultivo. En el caso del gen *tri14*, su nivel de expresión a lo largo del tiempo se asemeja al de los genes estructurales, aunque con un pequeño incremento a las 96h (hecho observado también en el gen *tri12*). Si comparamos los niveles de expresión de los genes *tri* entre sí, encontramos que el *tri3* es el que se expresa a menor nivel (incluso a las 96h no es detectable) y el que más se expresa, con gran diferencia, es el *tri4*. Este patrón de expresión es similar al descrito en *F. sporotrichioides* (Brown *et al.*, 2004).

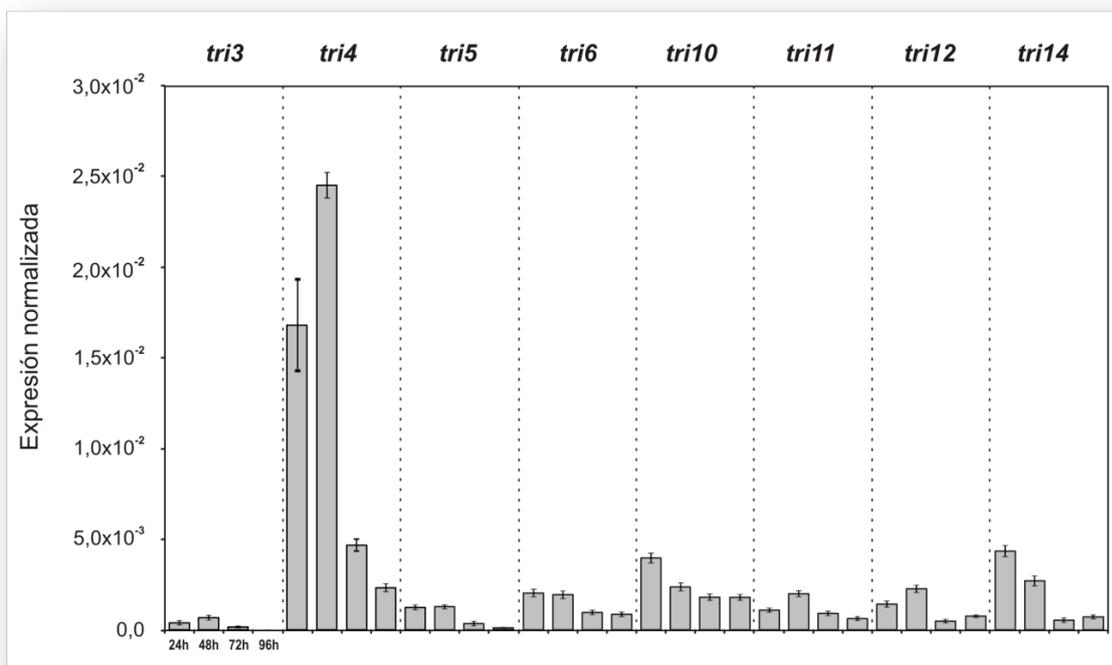


Figura 31. Expresión de los genes *tri* de Ta37 a lo largo del tiempo. Análisis mediante qPCR de la expresión de los genes *tri* desde las 24 hasta las 96h de cultivo en PDBs. Se indica la media y la desviación estándar de 3 mediciones. Para el análisis de los datos se empleó el software Q Gene (Muller *et al.*, 2002).

4. Purificación y análisis del harzianum A.

A la hora de estudiar la ruta de biosíntesis y la producción de HA por parte de Ta37 nos encontramos con la dificultad de la ausencia de estándares comerciales puros de este compuesto, imprescindibles para poner a punto los sistemas de detección y análisis del HA que constituirían una herramienta básica a lo largo de esta Tesis Doctoral. Por ello, se hizo necesario el desarrollo de un método de purificación y análisis del HA que nos permitiese obtener la suficiente cantidad de compuesto puro como para ser utilizado como estándar.

Una búsqueda bibliográfica reveló la existencia de 3 métodos descritos para el análisis del HA. Uno de ellos (Nielsen *et al.*, 2005) no era aplicable a nuestras necesidades ya que consistía en el análisis mediante GC-MS, lo cual suponía la destrucción de la muestra. Los otros 2 consistían en análisis mediante HPLC empleando columnas de fase reversa en las que la fase móvil sería una mezcla de acetonitrilo:agua (Corley *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2005). La técnica de HPLC nos permitiría purificar el HA mediante el aislamiento de las fracciones en las que eluyera el compuesto, sin embargo seguía existiendo un problema: ¿cómo identificar esas fracciones? Para ello nos ayudamos de la actividad antifúngica descrita para los trichotecenos frente a la levadura *Kluyveromyces marxianus* GK1005 (Engler *et al.*, 1999; Sukroongreung *et al.*, 1984).

4.1. Selección del pico cromatográfico candidato a ser el HA.

Las muestras extraídas con acetato de etilo a partir de 1 ml de sobrenadante proveniente de cultivos de Ta37 en medio PDBs fueron analizadas por HPLC, inicialmente siguiendo el protocolo descrito por Lee y colaboradores en 2005, utilizando la columna de fase reversa ODS-H80 150 x 4,6 mm I.D. S-4 μ m, 8nm (YMC Waters) y un volumen de inyección de 20 μ l. Las condiciones en las que se llevó a cabo la cromatografía analítica se fueron optimizando para mejorar la resolución de los picos obtenidos en el cromatograma, hasta que se estableció el protocolo descrito en el apartado 10.2.2. de materiales y métodos. Se recogieron las 9 fracciones, de un minuto cada una, equivalentes a todos los picos obtenidos en el cromatograma a 306 nm de longitud de onda (máximo de absorción descrito para el HA) y con ellos se llevó a cabo un bioensayo frente a la levadura *K. marxianus* (ver materiales y métodos 12) (Fig. 32). Solamente las fracciones correspondientes a los minutos 20, 21 y 22 presentaron actividad antifúngica frente a la levadura por lo que los compuestos eluidos entre esos minutos eran firmes candidatos a ser el HA, debido a que es el único

trichoteceno producido por la cepa Ta37 (Nielsen *et al.*, 2005). Otro dato que apoyaba la identidad del pico de 22,9 min como HA fue que su espectro de absorción coincidía con el descrito para este compuesto.

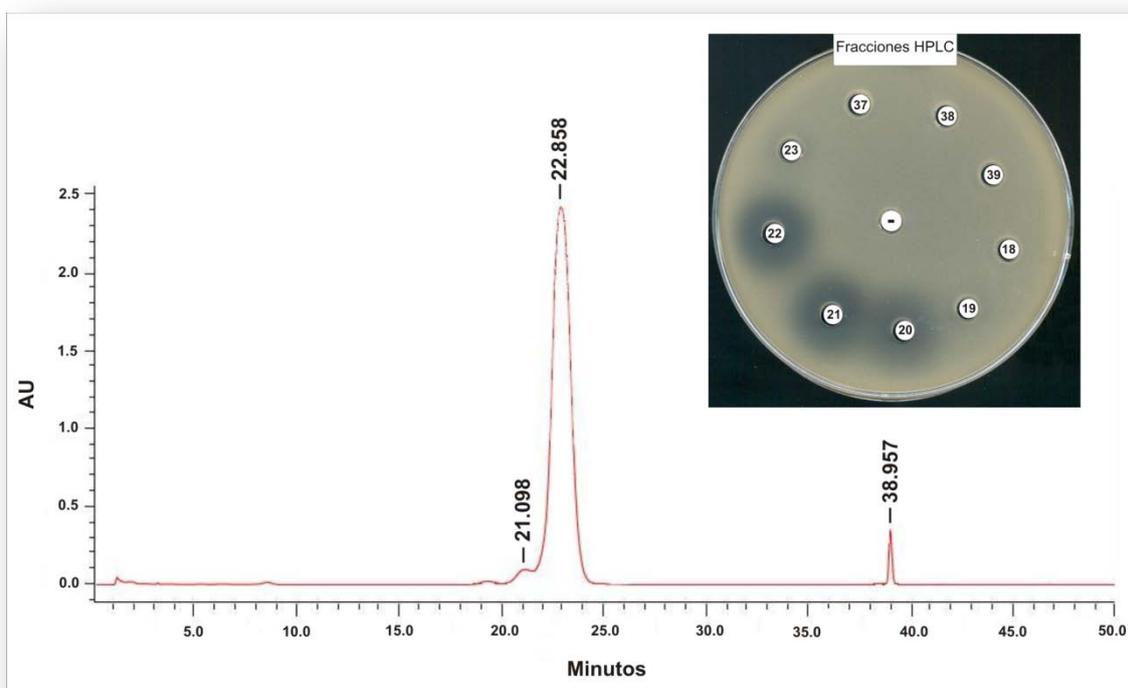


Figura 32. Cromatograma obtenido mediante HPLC a 306 nm a partir del sobrenadante de Ta37 extraído con acetato de etilo. El tiempo de retención de los picos principales se indica sobre cada uno de ellos. Para comprobar la actividad antifúngica de cada uno de estos picos, se realizó un bioensayo frente a *K. marxianus* con las fracciones de HPLC correspondientes a los mismos. Los números en la placa del bioensayo indican el minuto en el que se obtuvo cada fracción.

Un estudio preliminar mediante HPLC de muestras extraídas tomadas a lo largo del tiempo a partir de 1 ml de cultivo de Ta37 reveló que el pico que hipotéticamente correspondía al HA era mayor entre las 24 y las 48h, optándose por este segundo tiempo para la purificación del compuesto.

4.2. Purificación del HA mediante HPLC semipreparativa.

Una vez determinadas las hipotéticas fracciones que contenían el HA y el momento en el que su supuesta producción era mayor, se desarrolló un método cromatográfico para

purificarlo. Este método consistió en una HPLC semipreparativa cuyos parámetros estuvieron basados en los empleados durante el método analítico, pero adaptados para un mayor volumen de muestra (100 μ l), empleando para ello una columna de fase reversa ODS-H80 150 x 10 mm I.D. S-4 μ m, 8nm (YMC Waters) tal y como se indica en el apartado 10.2.1 de materiales y métodos.

Tras esta purificación sería necesario un análisis mediante espectrometría de masas para determinar su identidad y pureza, por lo que se desarrolló un método de extracción más riguroso que el empleado para el análisis rutinario de muestras. Se partió de 1 litro de cultivo de Ta37 en medio PDBs, que fue filtrado a través de nytal a los 2 días de fermentación para separar el micelio del sobrenadante. Los cultivos de hongos suelen contener un gran número de compuestos, tales como azúcares y proteínas, que pueden interferir en la purificación del compuesto e incluso degradar o modificar la actividad de ese metabolito. Con el fin de precipitar la mayor parte de las proteínas y azúcares presentes en la muestra, se hizo un tratamiento del caldo con un volumen de acetona. Una vez evaporada la acetona en vacío en un rotavapor, el caldo se extrajo con un volumen de acetato de etilo agitando vigorosamente, dejando separar las fases en un embudo de decantación (Fig. 33.A) y recuperando la fase superior, paso que se repitió 2 veces más para aumentar la eficacia de la extracción. Previo a la concentración de la muestra, el extracto se trató con Na₂SO₄ anhidro que actuó como desecante adsorbiendo las moléculas de agua presentes y facilitando así la posterior evaporación total de la muestra en un rotavapor en condiciones de vacío (Fig. 33.B). De este modo se obtuvo un precipitado blanco que fue resuspendido en acetonitrilo (Fig. 33.C) y almacenado a -20°C hasta su uso.



Figura 33. Proceso de extracción del HA para su posterior purificación. A) Tras la precipitación con acetona, el caldo fue extraído con acetato de etilo recuperándose la fase superior. B) Evaporación en el rotavapor de la muestra extraída. C) Muestra concentrada resuspendida en acetonitrilo. D) Bioensayo frente a la levadura *K. marxianus* del HA purificado disuelto en acetonitrilo (previamente se comprobó que este solvente no inhibía el crecimiento de la levadura).

Aplicando un volumen de inyección de 1ml (empleando un *loop* de 100 μ l), este compuesto fue analizado mediante HPLC semipreparativa, observándose un pico principal a los 34,8 min (Fig. 34.A) equivalente al pico de 22,9 min del método analítico (Fig. 32). Se inyectaron 40 muestras, se recogieron las fracciones correspondientes al pico de 34,8 min, se juntaron y concentraron en un rotavapor bajo condiciones de vacío. Al monitorizar mediante HPLC este proceso se vio que el compuesto correspondiente al pico deseado era degradado (Fig. 34.B). Debido a que las fracciones que se querían concentrar estaban formadas por una fase móvil compuesta por agua:acetonitrilo (60:40) y a que durante el proceso de concentración el primer elemento que se evaporaba era el acetonitrilo, se planteó la idea de que el compuesto que queríamos purificar fuese degradado cuando se encontraba disuelto solamente en agua. Para minimizar los efectos del agua sobre el compuesto, las fracciones recogidas se concentraron en un rotavapor en condiciones de vacío a 4°C durante 3h y se añadió $\frac{3}{4}$ del volumen resultante de diclorometano. Se recogió la fase del diclorometano (la inferior) y, para eliminar el resto de moléculas de agua presentes, se añadió Na_2SO_4 anhidro como desecante. Tras dejar reposar durante 1h, se evaporó completamente en rotavapor a 4°C obteniéndose 10,4 mg de un precipitado blanco que se resuspendió en acetonitrilo. Se analizó una muestra así concentrada en el HPLC, comprobándose que el compuesto deseado continuaba intacto (Fig. 34.C).

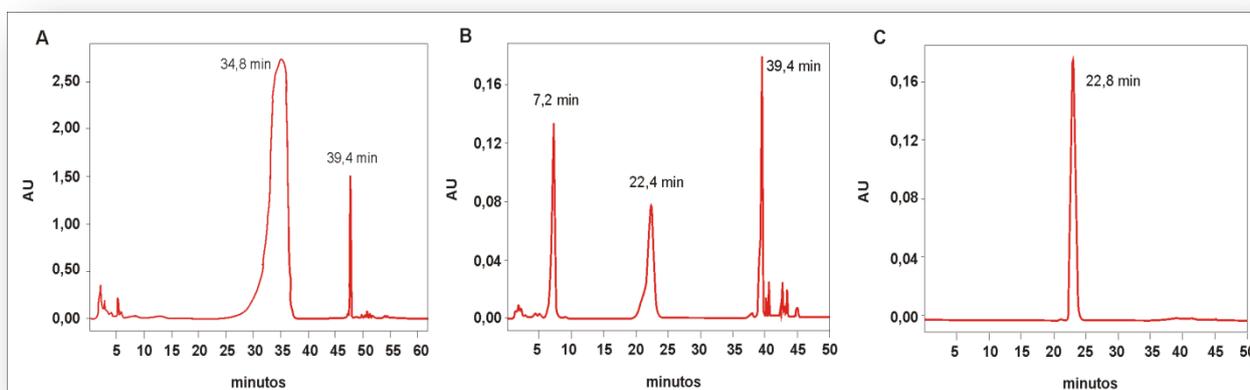


Figura 34. Cromatogramas (306 nm) del desarrollo del método de purificación del HA. A) Cromatograma obtenido mediante HPLC semipreparativa en el que se muestran los dos picos principales detectados, siendo el de 34,8 min el recogido para purificar el HA. B) Cromatograma obtenido mediante HPLC analítica a partir del compuesto purificado en el que se ve cómo el pico deseado (22,4 min) disminuye significativamente, apareciendo picos adicionales, indicando la degradación del compuesto. C) Cromatograma obtenido mediante HPLC analítica a partir del compuesto purificado empleando diclorometano, en el que se observa la integridad y pureza del compuesto que aparece a los 22,8 min.

Para la identificación del compuesto purificado, éste se analizó mediante resonancia magnética nuclear (NMR). Por comparación de los espectros $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ con los descritos para el HA por Corley y colaboradores en 1994 (anexo 3), se confirmó que el compuesto que eluía a los 22,9 min en HPLC analítica o a los 34,8 min en semipreparativa se trataba efectivamente del HA con un $\geq 99\%$ de pureza.

4.3. Análisis del HA mediante HPLC analítica.

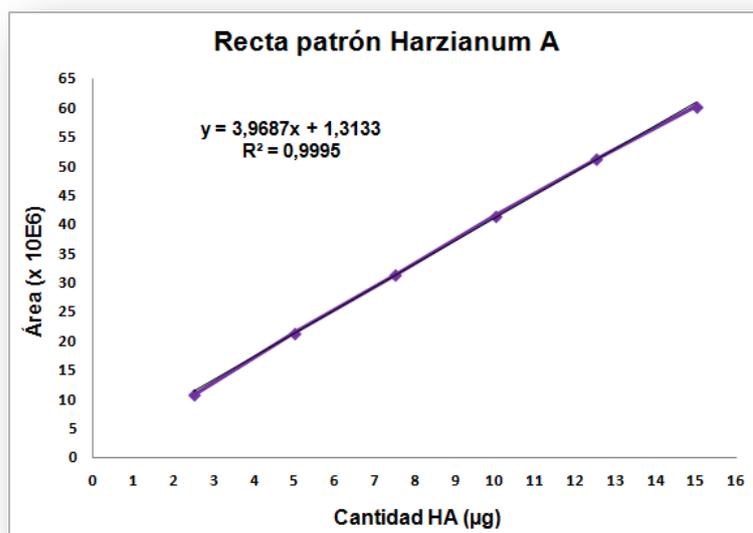
El siguiente paso consistió en la obtención de una recta patrón con diferentes concentraciones de HA sobre la que pudiésemos extrapolar los datos del área de los picos obtenidos mediante HPLC y conocer así la concentración de HA presente en diferentes muestras biológicas.

Se preparó una solución patrón de HA en acetonitrilo a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. A partir de ella se prepararon diferentes diluciones en acetonitrilo, teniendo en cuenta que al pincharlas en el HPLC el dato de absorbancia a 306 nm no superara la unidad para que los datos fuesen totalmente fiables. Tras analizar estas diluciones mediante HPLC analítica e integrar el área del pico correspondiente al HA, se obtuvo la recta patrón para el HA cuyo coeficiente de correlación fue de 0,9995 (Tabla 9; Figura 35). Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

Concentración HA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μg HA	Absorbancia 306 nm	Área del pico ($\times 10^6$)
0,125	2,5	0,16	10,749357
0,250	5	0,32	21,473955
0,375	7,5	0,48	31,548702
0,500	10	0,62	41,900379
0,625	12,5	0,77	51,465506
0,750	15	0,92	60,601261

Tabla 9. Datos para la construcción de la recta patrón de HA. Se analizaron $20 \mu\text{l}$ de las concentraciones indicadas mediante HPLC analítica.

Figura 35. Recta patrón de HA.



4.4. Dinámica de producción de HA en cultivos de Ta37.

Se estudió la producción de HA a lo largo del tiempo en cultivos de Ta37 en medio PDBs, junto con otros parámetros del cultivo como pH y crecimiento del hongo, desde las 14 hasta las 96h. Se analizaron muestras extraídas de 1 ml de cultivo mediante HPLC analítica determinándose que el máximo de producción del HA se alcanzaba a las 24h provocándose una ligera acidificación del medio (Tabla 10; Fig. 36). Contrariamente a lo que sucede con otros trichotecenos [por ejemplo, el máximo de producción de la toxina T-2 por parte de *F. sporotrichioides* ocurre a los 10 días de cultivo (McCormick y Hohn, 1997)], la mayor producción de HA se alcanzó en tiempos muy tempranos, cuando el micelio estaba todavía en fase de crecimiento (el máximo crecimiento, medido como peso seco, ocurría a las 48h de cultivo, Tabla 10; Fig.36).

Tiempo cultivo	pH	Peso seco (mg)	Producción HA (µg HA/ml/mg PS)
14h	5,99 ± 0,03	5,41 ± 0,19	28,85 ± 2,21
24h	5,85 ± 0,05	6,11 ± 0,05	29,29 ± 2,45
48h	5,52 ± 0,01	7,51 ± 0,01	23,33 ± 0,95
72h	6,92 ± 0,11	7,00 ± 0,14	14,29 ± 1,36
96h	7,76 ± 0,03	6,56 ± 0,02	8,46 ± 0,08

Tabla 10. Crecimiento de Ta37 y producción de HA en medio PDBs a lo largo del tiempo.

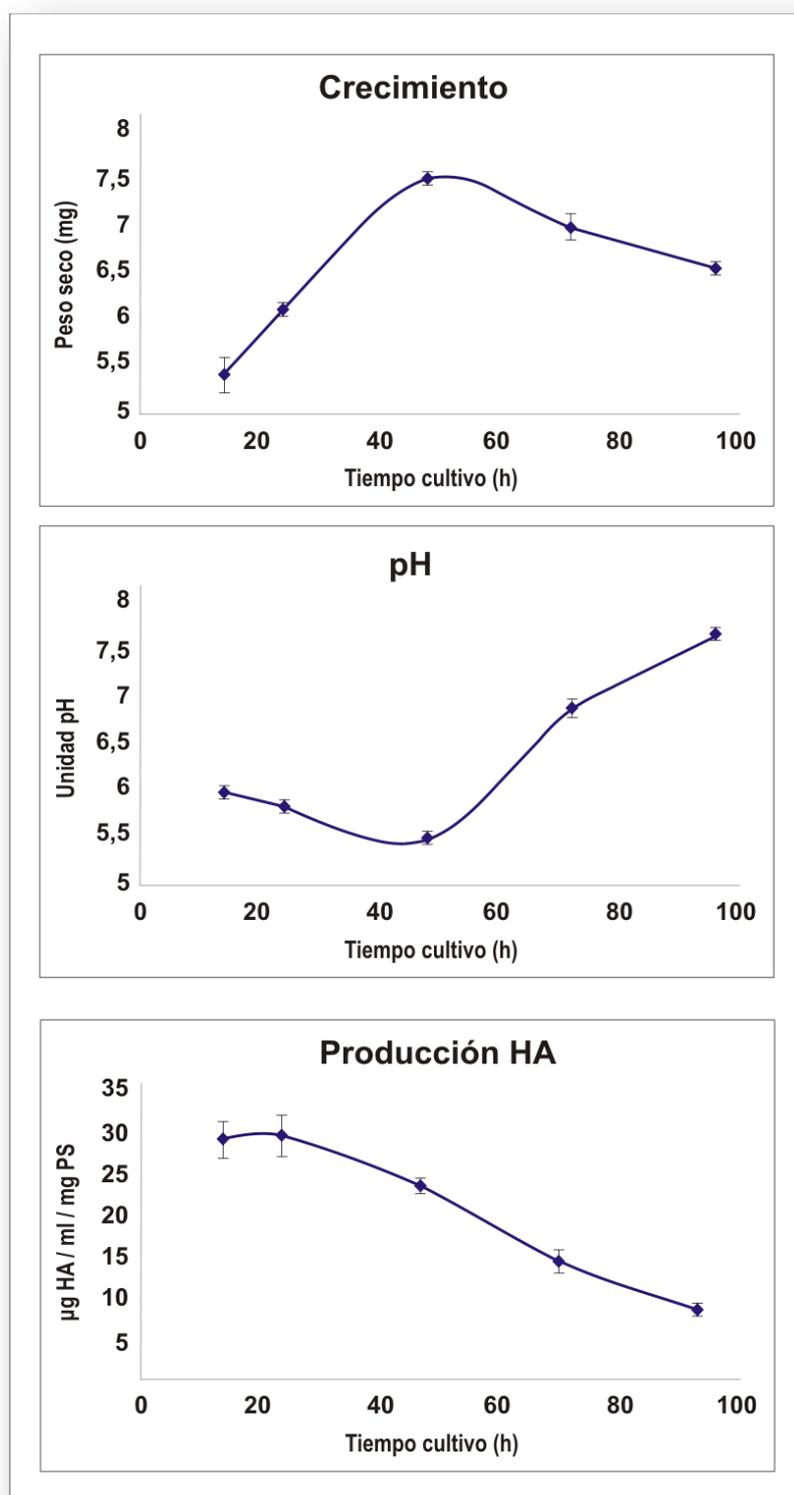


Figura 36. Dinámica de un cultivo de Ta37 en medio PDBs. Se muestran los datos recogidos desde las 14 a las 96h referentes a crecimiento, pH y producción específica de HA. Cada medida se tomó por triplicado.

DISCUSIÓN

Dentro del orden *Hypocreales*, la biosíntesis de trichotecenos y el *cluster* de genes *TRI* han sido extensamente estudiados en las especies *F. sporotrichioides* y *F. graminearum*, y se ha demostrado la existencia de un *cluster* de genes *TRI* en *Myrothecium roridum*. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral describen la biosíntesis de trichotecenos y ponen de manifiesto la existencia de un *cluster* de genes *tri* en un tercer género fúngico, *Trichoderma*. La presencia de la agrupación de los genes *tri/TRI* en el genoma de especies de *Fusarium*, *Myrothecium* y *Trichoderma* podría deberse a la existencia de un hongo productor de trichotecenos, antecesor común de los tres géneros, que tuviera el *cluster* de genes *tri/TRI*. Dicha agrupación podría haber ido evolucionando a lo largo del tiempo para dar lugar a los diferentes *clusters* que aparecen en cada uno de estos géneros fúngicos en los que, a pesar de sus marcadas diferencias en cuanto al número de genes que los conforman y a la posición y orientación relativas de los mismos, los genes codifican para enzimas con funciones muy conservadas entre las diversas especies. En el caso de *Trichoderma*, estas funciones se clasifican en biosintéticas (Tri3, Tri4, Tri11), reguladoras (Tri6, Tri10) y transportadoras (Tri12).

La diferencia en el contenido génico de los *clusters* de *Fusarium* y *Trichoderma* indica que los genes han ido añadiéndose o perdiéndose a lo largo de la evolución entre ambos géneros. Probablemente la diferencia más notable consista en la ausencia del gen *tri5* en el *cluster* de *Trichoderma*, mientras que en *Fusarium* ocupa un lugar central dentro de la agrupación génica principal. A pesar del hecho de que el gen *tri5* de *Trichoderma* no se encuentra dentro del *cluster*, no se ha determinado si se encuentran en el mismo o en diferentes cromosomas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo y aquellos descritos en la bibliografía (Hohn y Beremand, 1989) indican que los ortólogos *tri5/TRI5* de *Trichoderma* y *Fusarium*, respectivamente, codifican para una trichodieno sintasa, enzima que cataliza el primer paso específico de la ruta de biosíntesis de trichotecenos, habiéndose demostrado que esta enzima es esencial para la síntesis de este tipo de compuestos en ambos géneros. La localización del gen *tri5* fuera del *cluster* de genes *tri* en *Trichoderma*, pero dentro en *Fusarium* y *Myrothecium* (Trapp et al., 1998; R.H.Proctor comunicación personal) sugiere que la agrupación génica ancestral contenía el gen *tri5*, gen que cambió de localización a lo largo de la evolución del género *Trichoderma*. Este hecho podría ser un primer paso en la pérdida de la ruta, o simplemente reflejar la ausencia de presión selectiva

requerida para mantener el cluster (Keller y Hohn, 1997). Una vez que los genes se hubieran dispersado, podrían estar más disponibles para incorporarse a otras rutas o podrían actuar como germen para la constitución de una nueva ruta de biosíntesis.

Existen 2 principales hipótesis para explicar la agrupación de los genes de biosíntesis de algunos metabolitos secundarios en hongos (Keller *et al.*, 2005). La primera está relacionada con la transferencia, ya sea horizontal o vertical, de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de un compuesto entre diferentes especies, la cual se vería facilitada si todos esos genes se encontrasen agrupados. La segunda hipótesis sugiere que la función de los *clusters* de biosíntesis de metabolitos consiste en facilitar la expresión coordinada de los genes que los conforman. La localización del gen *tri5* de *Trichoderma* fuera del *cluster* de genes *tri* podría indicar que no necesariamente se adquirió junto con el resto de los genes, sin embargo su expresión sí se correlaciona con la de los otros genes *tri* y con la producción de trichotecenos (ver Resultados Capítulo 1, apartados 3 y 4). Varios *clusters* de genes de biosíntesis de metabolitos de naturaleza sesquiterpénica han sido caracterizados en hongos filamentosos, incluyendo los *clusters* del ácido abscísico y del botridial en *Botrytis cinerea* (Siewers *et al.*, 2006; Pinedo *et al.*, 2008), el *cluster* Ao en *Aspergillus oryzae* (Mukherjee *et al.*, 2006) y el *cluster* de giberelina en *Fusarium fujikuroi* (Malonek *et al.*, 2005). De entre todos estos *clusters*, solamente el del ácido abscísico de *B. cinerea* carece del gen que codifica para la terpeno ciclasa, enzima que cataliza la formación del primer intermediario específico de esa ruta de biosíntesis, de una forma análoga a lo que sucede con el gen *tri5* de *Trichoderma*.

El segundo análisis funcional llevado a cabo en esta Tesis Doctoral indicó que el gen *tri4* codifica para una citocromo P450 monooxigenasa que cataliza la oxigenación del trichodieno en las posiciones C-2, C-11 y C-13. Estas son las mismas reacciones llevadas a cabo por la enzima Tri4 de *M. roridum* (McCormick y Alexander, 2007). Por el contrario, la enzima Tri4 de *F. graminearum* cataliza la oxigenación del trichodieno en 4 posiciones: C-3, C-2, C-11 y C-13 (McCormick *et al.*, 2006). La incapacidad de las proteínas Tri4 de Ta37 y *M. roridum* de llevar a cabo la oxigenación en C-3 coincide con la ausencia de un oxígeno en dicha posición en los trichotecenos sintetizados por estas 2 especies (McCormick y Alexander, 2007; Nielsen *et al.*, 2005). A pesar de llevar a cabo la misma actividad, la similitud de la enzima Tri4 de Ta37 con su ortóloga de *M. roridum* es inferior (67%) a la que presenta con su ortóloga de *F. sporotrichioides* (73%). Estos datos indican que las diferencias en la función de esta proteína en los 3 géneros no están relacionadas con la similitud de sus secuencias. Teniendo en cuenta estos descubrimientos, ¿la enzima Tri4 ancestral catalizaba los 4 pasos de oxigenación y la capacidad de hacerlo en C-3 se perdió

durante la evolución? ¿u ocurrió todo lo contrario y la capacidad de oxigenar el C-3 se adquirió a lo largo del tiempo? Comparaciones filogenéticas y funcionales de los ortólogos de otras especies productoras de trichotecenos (como *Stachybotrys* o *Trichothecium*) con los de *Fusarium*, *Trichoderma* y *Myrothecium* podrían ayudar a resolver la cuestión sobre la evolución del gen *tri4*.

En este estudio se ha demostrado que la enzima citocromo P450 monooxigenasa, codificada por el gen *tri11* de Ta37, cataliza la hidroxilación en posición C-4 del EPT. Este dato fue inesperado ya que en *F. sporotrichioides* esta reacción es llevada a cabo por una monooxigenasa diferente, codificada por el gen *TRI13*. Por lo tanto, a pesar de que *Trichoderma* y *Fusarium* emplean el mismo mecanismo enzimático para la hidroxilación en posición C-4, los 2 géneros no utilizan enzimas ortólogas para catalizar dicha reacción. Este hecho sugiere que las enzimas responsables de la hidroxilación en C-4 de los trichotecenos de *Trichoderma* y *Fusarium* han evolucionado de modo independiente. Hasta donde se conoce, este es la primera aportación que describe enzimas no ortólogas que catalizan la misma modificación estructural durante la biosíntesis de metabolitos secundarios relacionados en diferentes géneros fúngicos. A pesar de que las modificaciones estructurales catalizadas por las proteínas Tri11 en Ta37 y Tri13 en *F. sporotrichioides* son las mismas, los sustratos y los productos de las mismas no lo son ya que el sustrato de la enzima Tri11 de Ta37 es el EPT para dar lugar al trichodermol, mientras que la enzima Tri13 de *F. sporotrichioides* convierte la calonectrina en 3,15-diacetoxiescirpenol (Brown *et al.*, 2002).

La enzima Tri11 de *Fusarium* también lleva a cabo una reacción de hidroxilación, pero en vez de hacerlo en posición C-4 como en *Trichoderma*, lo hace en posición C-15. A pesar de esta diferencia, se ha mantenido el nombre del ortólogo de *Trichoderma* como *tri11* debido a que el análisis de su secuencia mediante BLASTX mostraba una alta homología (*score* = 382; *E value* de 1e-88) con la proteína Tri11 de *Fusarium*, pero no con la Tri13. No obstante, de los 8 genes *tri* identificados en este estudio, es el gen *tri11* el que muestra una menor homología con su ortólogo de *F. sporotrichioides* (38%), mientras que el resto de los genes oscilan entre un 46 y un 73% de homología con su ortólogo correspondiente en *F. sporotrichioides* (Tabla 7). Además, el número y localización de los intrones en los ortólogos *tri11/TRI11* es significativamente diferente: mientras que el gen *tri11* de Ta37 contiene un solo intrón cerca de su extremo 3', en el gen *TRI11* de *F. sporotrichioides* se localizan 4 intrones dispersos a lo largo de toda su secuencia. Curiosamente, el gen *tri11* muestra una mayor similitud con proteínas de otros hongos más distantes filogenéticamente que con el gen de *Fusarium*. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la enzima Tri11 de Ta37

presenta una homología del 58 y del 42% con la proteína ATEG_08832 de *Aspergillus terreus* (clase *Eurotiomycetes*) y con la proteína SS1G_13923 de *Sclerotinia sclerotiorum* (clase *Leotiomycetes*), respectivamente. Estos datos sugieren que a pesar de que las proteínas Tri11 de Ta37 y *F. sporotrichioides* comparten un antecesor común, el antecesor más reciente podría no ser un gen de biosíntesis de trichotecenos y podría haber aparecido en un hongo lejanamente emparentado con los *Hypocreales*. Una posible explicación es que el *cluster* ancestral de genes *tri* careciera del ortólogo *tri11/TRI11* y que su adquisición por parte de *Trichoderma* y de *Fusarium* hubiera ocurrido de forma independiente y a partir de diferentes orígenes. Otra posible explicación para este fenómeno es que el *cluster* ancestral sí contuviera el gen *tri11/TRI11* pero que a lo largo de la evolución se hubiera perdido en alguno de los dos géneros fúngicos y más adelante se hubiera adquirido de nuevo a partir de otro homólogo más distante filogenéticamente. A pesar de los diferentes orígenes de los ortólogos *tri11/TRI11*, estos ocupan un lugar conservado con respecto al resto de genes *tri* en ambos *clusters*. Si la posición de este gen es fortuita o si tiene algún significado funcional permanece sin ser determinado.

Aunque no se ha caracterizado la función del gen *tri3*, su similitud con los correspondientes ortólogos de *Fusarium* sugiere su función. En *Fusarium*, la proteína Tri3 es una acetiltransferasa que cataliza la acetilación del oxígeno en posición C-15 del esqueleto trichoteceno (McCormick *et al.*, 1996). Sin embargo, los trichotecenos producidos por *Trichoderma* carecen de este oxígeno, por lo que la función de la enzima no puede ser exactamente la misma (el estudio funcional de los genes *tri4* y *tri11* ha demostrado que los ortólogos de los genes *tri* pueden ejercer diferentes funciones en *Trichoderma* y *Fusarium*). Se sugiere la posibilidad de que la proteína Tri3 de Ta37 actúe como una acetiltransferasa debido a la elevada similitud entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas Tri3 de *Trichoderma* y *Fusarium*, y a que en la proteína Tri3 de Ta37 se encuentra el motivo HXXXDG, indicativo de las acetiltransferasas (Murray y Shaw, 1997). Basándose en todos estos datos, la posible función de la proteína Tri3 de Ta37 sería la acetilación en posición C-4 del esqueleto trichoteceno. Esta hipotética función concuerda bien con la presencia de un grupo acetilo en la posición C-4 de la trichodermina, el trichoteceno producido por *T. brevicompactum*. Por otro lado, está descrito que algunas acetiltransferasas son capaces de utilizar grupos acilo en vez de grupos acetilo como sustratos (St. Pierre y De Luca, 2000). Si la enzima Tri3 de Ta37 emplea este tipo de sustrato, sería capaz de catalizar la esterificación del ácido octatriendioico con el oxígeno del C-4 para dar lugar al HA. Esta hipótesis podría ser comprobada mediante inactivación génica ya que, si la enzima Tri3 es la

responsable de esta esterificación, la inactivación del gen *tri3* en *Trichoderma* daría lugar a la acumulación de trichodermol.

Los trichotecenos de *Trichoderma*, trichodermina y HA, tienen estructuras más simples que los trichotecenos producidos por *Fusarium*, sugiriendo que un número menor de genes está implicado en su biosíntesis. Los resultados de la caracterización molecular y funcional de los genes *tri* en *Trichoderma* son coherentes con esta relativa simplicidad estructural y sugieren una ruta biosintética del HA que requiere un número menor de actividades enzimáticas: Tri5 para la formación de trichodieno, Tri4 para la oxigenación del trichodieno dando lugar al EPT, Tri11 para la oxigenación del EPT en posición C-4 y Tri3 para la acilación del oxígeno en C-4 (Fig. 37). La formación del HA podría requerir la actuación de otra enzima, posiblemente una poliquétido sintasa (PKS), para la síntesis del ácido octatriendioico, compuesto que forma la “cola” del HA. La ausencia de un gen que codifique para una PKS en las regiones adyacentes a los genes *tri* de Ta37 sugiere la posible existencia de un tercer *locus* que contenga dicho gen, implicado en la síntesis del ácido octatriendioico. La producción de trichodermina no requeriría genes estructurales adicionales ya que un reservorio celular de acetil-CoA estaría disponible para la acetilación del oxígeno en C-4. La participación de PKSs en la biosíntesis de otras micotoxinas (cuyos genes de síntesis se encuentran agrupados en *clusters*) se ha demostrado anteriormente, como es el caso de las fumonisinas en *Gibberella fujikuroi* (Proctor *et al.*, 1999) o de las toxinas AAL en *Alternaria alternata* (Bottini *et al.*, 1981).

Aparentemente, el máximo nivel de expresión de los genes estructurales no se corresponde con el máximo nivel de producción de HA, que ocurre a las 24h (ver apartado 4.3.). Aunque se necesiten más estudios para entender este fenómeno, la estabilidad de los ARNs mensajeros, la posible saturación del sistema de transporte al exterior celular, la escasez de precursores (como podría ser el FPP, que participa en la síntesis de otros compuestos como el ergosterol) o del ácido octatriendioico podrían explicar este resultado.

A lo largo de este trabajo se optimizó un método de purificación del HA que requería un menor número de pasos que los anteriormente descritos (Corley *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2005), siendo por tanto más sencillo y económico a la vez que se obtuvo una pureza superior al 99%. Un dato peculiar sobre la producción de HA por parte de la cepa Ta37 es que su mayor nivel se alcanza a tiempos muy tempranos de cultivo, a las 24 h en medio PDBs, cuando el hongo aún se encuentra en fase de crecimiento. McCormick y Hohn en 1997 analizaron caldos de cultivo de *F. sporotrichioides* durante 10 días en busca de toxina T-2 y varios intermediarios de su biosíntesis y observaron que el nivel de producción de

toxina T-2 iba incrementándose a partir del tercer día de cultivo, alcanzando su mayor nivel en el décimo día.

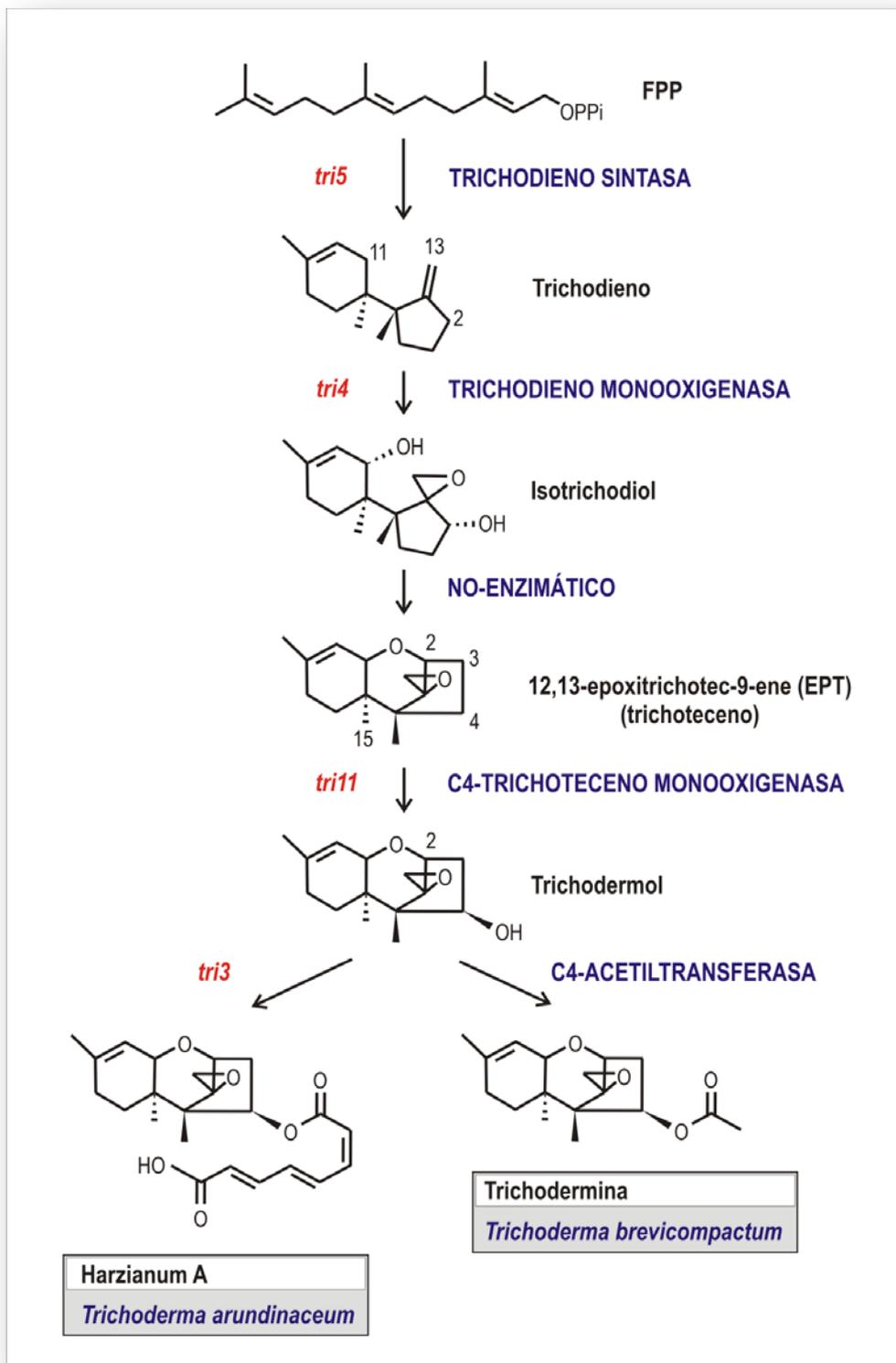
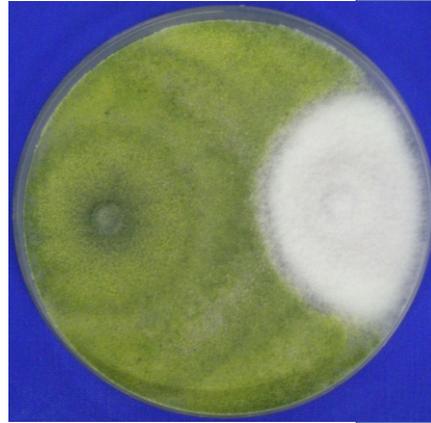


Figura 37. Hipotética ruta de biosíntesis de trichotecenos en *Trichoderma*. En cada paso se indican el gen (rojo) y la enzima (morado) implicados.

Capítulo 2



Enfrentamiento entre Ta37 (izquierda) y *Fusarium oxysporum* (derecha).

Efecto antagonista de la cepa Ta37 sobre hongos fitopatógenos: papel del harzianum A.

Interacciones entre Ta37 y el patógeno *Botrytis cinerea*.

INTRODUCCIÓN

1. Mecanismos de antagonismo ejercidos por *Trichoderma*.

El género *Trichoderma* lleva empleándose durante décadas como ACB, sin embargo, al inicio de su aplicación se pensaba que solamente sería eficaz frente a un rango muy estrecho de patógenos, debido a la especificidad de sus antibióticos y enzimas degradadoras de la pared celular. Ahora se sabe que, si se aplican correctamente, algunas cepas poseen una buena capacidad antagónica frente a un amplio número de patógenos (Harman, 1990), convirtiéndolas en buenas ACBs.

La capacidad de antagonismo de *Trichoderma* frente a otros hongos se basa en 3 mecanismos diferentes: la competición, la antibiosis y el micoparasitismo. Estos procesos no son excluyentes, de hecho está demostrado que actúan sinérgicamente entre ellos. Esta capacidad antagónica depende de varios factores como son la cepa de *Trichoderma* empleada, el organismo diana y las condiciones ambientales (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

1.1. Antagonismo por competición.

El éxito en la colonización de un nuevo hábitat depende de la capacidad del organismo para defender su nicho ecológico y de la competición eficaz por diferentes recursos limitantes.

Se entiende por competición *el desigual comportamiento de dos o más organismos por un mismo requerimiento, de forma que la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad disponible para los demás*. La competición más frecuente está originada por el aprovechamiento de nutrientes, oxígeno, espacio y luz. El hecho de que *Trichoderma* se encuentre en suelos de todo el mundo indica su gran capacidad competitiva tanto por los nutrientes como por el espacio, sin embargo esta capacidad se ve afectada por factores

como la temperatura, la humedad, el pH del suelo y la presencia de antagonistas o pesticidas (Papavizas, 1985).

Por ejemplo, la competición por el espacio es el mecanismo que asegura la protección de los racimos de uva frente a la “*podredumbre gris*” causada por *B. cinerea*, ya que este patógeno no puede instalarse en los capuchones florales de viñas que han sido colonizados previamente por *T. harzianum* (Dubos *et al.*, 1982).

Existen varios mecanismos, no excluyentes entre sí, que hacen que *Trichoderma* sea un buen competidor en la rizosfera:

- **Fungistasis:** un buen antagonista ha de ser capaz de superar el efecto fungistático generado por metabolitos producidos por otras especies y de sobrevivir bajo condiciones de competición muy extremas. En *Trichoderma*, esta resistencia a compuestos tóxicos se asocia a la presencia de sistemas de transporte tipo ABC (Harman *et al.*, 2004).

En presencia de *T. atroviride*, el patógeno *R. solani* produce ROS como moléculas señaladoras y compuestos antifúngicos (Aliferis y Jabaji, 2010) que provocan la inducción de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo y en los procesos de detoxificación (como transportadores ABC) que hacen que *T. atroviride* sea resistente a “las armas defensivas” del hongo huésped (Seidl *et al.*, 2009).

- **Competición por nutrientes:** la principal causa de muerte de los microorganismos es la falta de nutrientes, por lo que la competición por ellos es un modo de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos. Por ejemplo, la toma de hierro es esencial para la supervivencia de los hongos filamentosos, que bajo condiciones de “hambre” de hierro producen compuestos quelantes de iones férricos (sideróforos) para solubilizar el hierro del ambiente (Eisendle *et al.*, 2004). Algunas cepas de *Trichoderma* usadas como ACBs producen sideróforos muy eficientes que captan el hierro deteniendo así el crecimiento de otros hongos (Chet e Inbar, 1994). Y no sólo ocurre con el hierro, *Trichoderma* tiene una capacidad superior para movilizar y captar otros nutrientes del suelo debido a su habilidad para obtener ATP a partir de diferentes carbohidratos, como la celulosa o la quitina.

Este tipo de competición ha demostrado ser de particular importancia frente a *B. cinerea*, ya que este hongo es especialmente sensible a la falta de nutrientes (Latorre *et al.*, 2001).

- Dentro de la competición podría incluirse la capacidad de *Trichoderma* para **modificar la rizosfera**: uno de los factores más importantes para la actividad de los hongos (ya sean patógenos o no) es el pH del suelo. Por ejemplo, algunos antibióticos producidos por dichos organismos pueden ser degradados a pH altos; mientras que a pH bajos se puede inducir la degradación de enzimas extracelulares secretadas por los hongos mediante proteasas ácidas producidas por otros organismos sensibles a dichas enzimas (Delgado-Jarana *et al.*, 2000). El pH externo también es muy importante para los patógenos ya que sólo producen factores de patogenicidad bajo un rango muy estrecho de pH (Benítez *et al.*, 2004).

Mediante un sistema de respuesta al pH, *T. harzianum* es capaz de adaptar su metabolismo al pH externo e incluso modificar dicho pH para asegurar unas condiciones óptimas para las enzimas que secreta (McIntyre *et al.*, 2004). Este sistema de respuesta al pH está modulado por el factor transcripcional PacC, activador de genes de respuesta a pH alcalino y represor de los de respuesta a pH ácido, en condiciones de elevado pH.

1.2. Antibiosis.

La antibiosis se define como *la inhibición del crecimiento de un organismo por un producto metabólico producido por otro, sin que medie contacto físico entre ellos*. Muchas cepas de *Trichoderma* liberan metabolitos secundarios de bajo peso molecular o antibióticos que producen este efecto. Weindling (1934) describió la actividad antibiótica de *Trichoderma* al observar que *T. lignorum* tenía un efecto antagonista de este tipo frente a otros hongos.

El género *Trichoderma* es conocido por su gran capacidad de producción de metabolitos secundarios de muy diversa naturaleza (revisado en Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998). Muchos de estos compuestos tienen demostrada actividad antibiótica impidiendo el crecimiento y la colonización de sus organismos diana (o incluso provocando su muerte) y pueden ser clasificados en base a su estructura en 2 grupos principales (Cardoza *et al.*, 2005):

- Compuestos de bajo peso molecular y metabolitos volátiles: incluyen compuestos aromáticos simples, butenólidos, algunos poliquétidos y pironas (6-pentil- α -pirona), metabolitos isociánicos, terpenos (viridina, trichotecenos) y

sustancias no polares (Webster y Lomas, 1964; Corley *et al.*, 1994). Debido a sus características, algunos de estos compuestos pueden ejercer su acción a larga distancia.

- Metabolitos de alto peso molecular y polares como los peptaiboles (alameticinas o trichorzianinas) con una probada actividad antibiótica frente a bacterias Gram-positivas (Wiest *et al.*, 2002) y su papel en la inhibición de β -glucano sintasas del hongo huésped (Lorito *et al.*, 1996). Su acción está más localizada en zonas próximas al micelio productor.

Algunos autores sugieren que la antibiosis es el mecanismo principal para explicar el control biológico de *Trichoderma* (ya que se ha visto que, en algunos casos, la aplicación de antibióticos purificados ejerce un nivel de biocontrol análogo al producido por el microorganismo completo), incluso que la función de las enzimas hidrolíticas se reduce al saprofitismo, una vez que los antibióticos han causado la muerte del huésped (Belanger *et al.*, 1995). Sin embargo, otros autores señalan el papel determinante de las enzimas hidrolíticas e incluso ponen en duda el papel de los antibióticos en el control biológico en algunos casos: Howell y Stipanovic (1995) describieron cómo mutantes de *T. virens* no productores de antibióticos controlaban la infección de semillas de algodón por parte de *Rhizoctonia solani* tan eficazmente como la cepa silvestre. A pesar de todo esto, la idea más extendida es que cuando se une el efecto de estos compuestos tóxicos al de las enzimas hidrolíticas, el nivel de control del patógeno es mucho mayor (Howell, 2003).

Como ha quedado demostrado, sobre este punto existe una gran controversia y es necesario un estudio más profundo acerca del grado de implicación de la antibiosis en el control biológico por *Trichoderma* y señalar en qué especies es más relevante.

1.3. Micoparasitismo.

Se define como *la relación que un organismo establece con un hongo huésped de manera que se beneficia del mismo, normalmente obteniendo nutrientes, sin aportarle nada a cambio y en ocasiones causando su muerte*. Existen dos tipos de parásitos: los biotróficos, que mantienen su relación con células vivas largos periodos de tiempo obteniendo nutrientes a partir de ellas, y los necrotrofos, que destruyen rápidamente a las células para

alimentarse de su contenido. Existen otros patógenos, los hemibiotrofos, que combinan ambos estilos de vida (Pieterse *et al.*, 2009).

Este mecanismo puede ser aprovechado en el biocontrol cuando el hongo huésped es un fitopatógeno y el organismo que lo antagoniza es inocuo para el cultivo sobre el que se aplica. Se conocen hongos micoparásitos dentro de los principales grupos taxonómicos y varios dentro del género *Trichoderma*.

Este fenómeno en *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Weindling (1934) sobre *Rhizoctonia*. Más tarde se han descrito otros hongos parasitados por *Trichoderma* dentro de géneros como *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dermatophora*, *Fusarium*, *Monilia*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pythium*, *Sclerotinia*, o *Verticillium* (Monte, 2001).

El complejo proceso del micoparasitismo se puede dividir en varias fases y comprende cambios morfológicos y producción de enzimas líticas y antibióticos por parte del hongo “depredador” (Chet, 1990):

- **Aproximación del micoparásito al hongo huésped** (Figs. 38.A y 39). Se sabe que *Trichoderma* es capaz de detectar a su huésped a distancia, probablemente gracias a un gradiente químico ya que parece ser que secreta exoquitinasas a bajo nivel de forma constitutiva que, cuando encuentran a un hongo diana, degradan su pared celular liberando pequeños péptidos que hacen que *Trichoderma* crezca por tropismo hacia el patógeno, comenzando así el proceso antes, incluso, de que medie contacto físico entre ambos organismos (Howell, 2003). En la superficie de las hifas de *Trichoderma*, estos péptidos se unen a receptores acoplados a proteínas G (como el receptor Gpr1) o a receptores de detección de nitrógeno, activando una cascada de señalización mediada por proteínas G y MAPKs que, en última instancia, modularían la actividad de factores de transcripción (TFs) aún por identificar. Estos TFs aumentarían la expresión constitutiva de algunos genes que codifican para enzimas líticas o intervienen en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Druzhinina *et al.*, 2011).
- **Contacto hospedador-parásito.** *Trichoderma* se une a la pared del patógeno y se enrolla en torno a él formando un apresorio (Figs. 38.B.D.E y 39). Este reconocimiento está mediado por lectinas del hospedador a las que se unen residuos azucarados de la pared celular de *Trichoderma* (generalmente

galactosa o fucosa), lo que garantiza la especificidad de la interacción (Inbar y Chet, 1992).

- **Penetración en el interior del hospedador.** En las zonas de contacto con *Trichoderma*, se han observado orificios en las hifas del hongo parasitado (Harman *et al.*, 2004) (Fig. 38.C.F). A través de estos agujeros, *Trichoderma* entra al interior del micelio hospedador alimentándose de su contenido intracelular. Está claro que en este proceso las enzimas extracelulares (quitinasas, glucanasas y proteasas) de *Trichoderma* juegan un papel fundamental degradando la pared del hongo.
- **Digestión del hospedador.** La muerte final del hospedador se debe a una acción conjunta de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas producidas por *Trichoderma*.

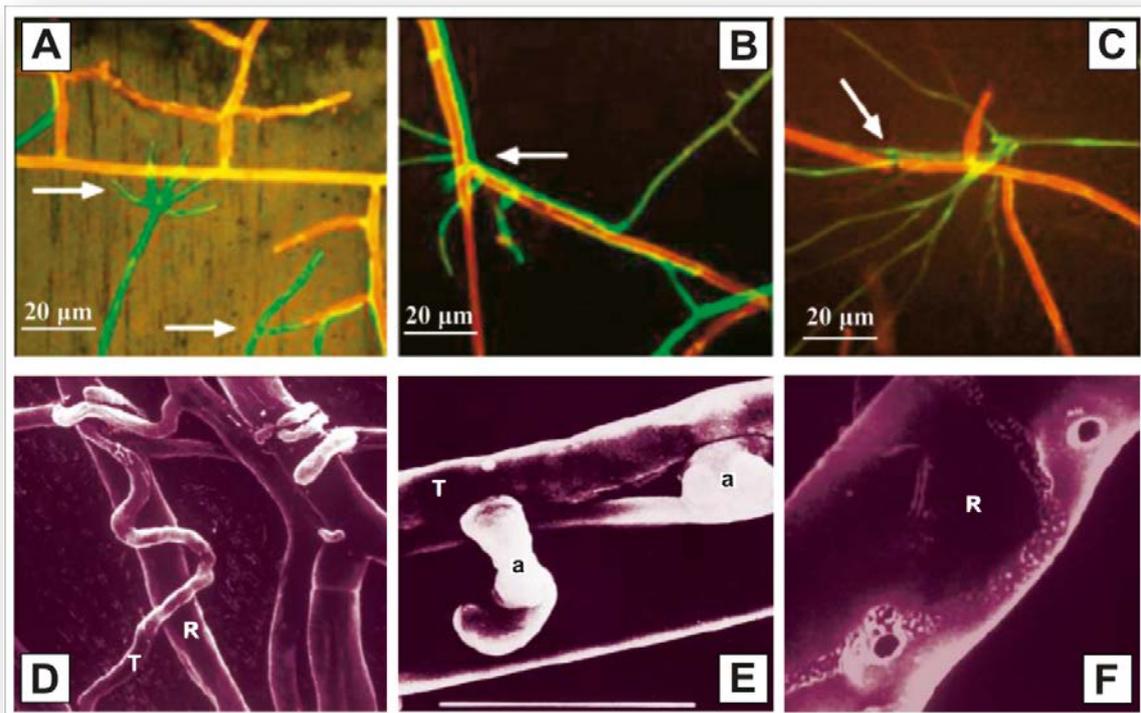


Figura 38. Microfotografías representando las diferentes fases del proceso de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* sobre el patógeno *Rhizoctonia solani*. Paneles A, B y C: Imágenes de microscopía confocal de barrido con láser que muestran la interacción entre *T. atroviride* transformada con la proteína GFP (hifas verdes) y *R. solani* (hifas anaranjadas) tomadas de Lu *et al.*, 2004. A: Las flechas muestran hifas de *T. atroviride* aproximándose al patógeno. B: Se observa cómo *T. atroviride* se enrolla en torno a las hifas de *R. solani* y en C la flecha indica un punto de rotura de la hifa del patógeno. Paneles D, E y F: Microfotografías obtenidas mediante microscopio electrónico tomadas de Harman *et al.*, 2004. D y E: Enrollamiento de *Trichoderma* (T) sobre las hifas de *R. solani* (R) y formación de apresorios (a). F: Orificios en las hifas del patógeno tras la acción de las enzimas hidrolíticas de *Trichoderma*.

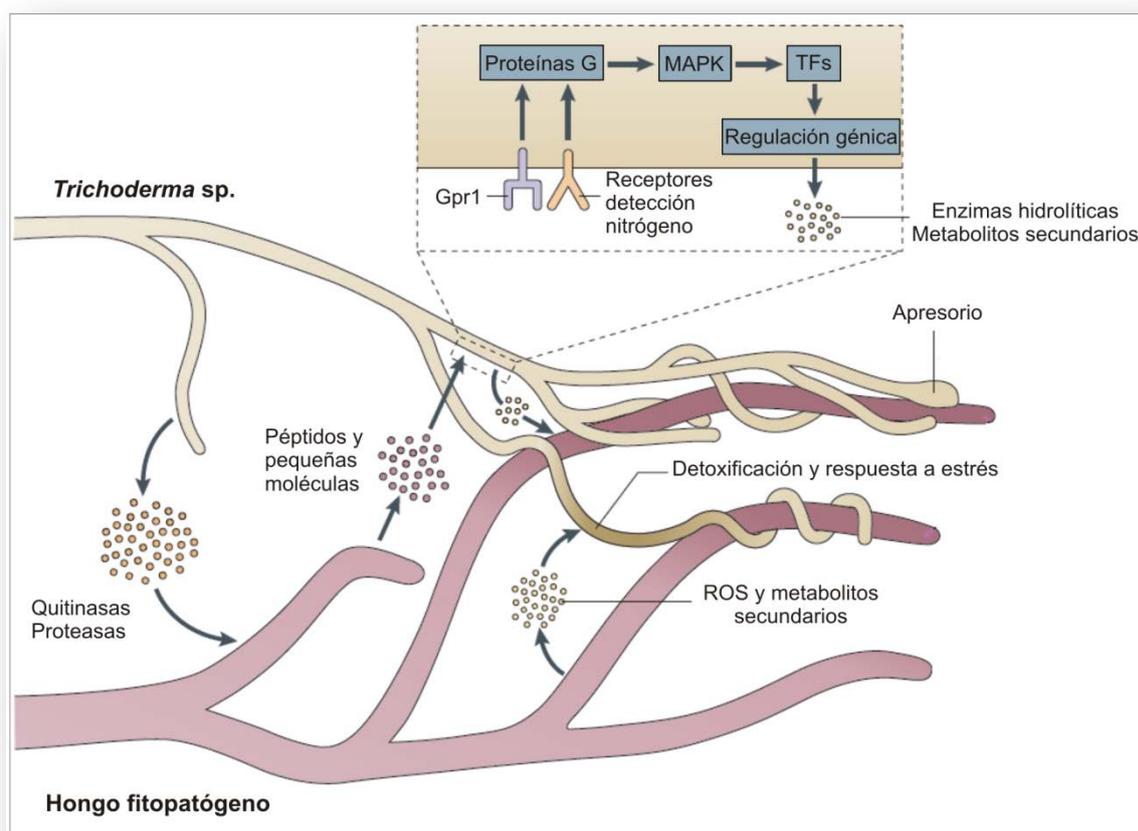


Figura 39. Elementos implicados en el micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* frente a otros hongos. Al mismo tiempo que *Trichoderma* detecta a su “presa” y pone en marcha la maquinaria necesaria para ejercer su actividad micoparasítica, el fitopatógeno responde liberando metabolitos secundarios y ROS con el fin de defenderse, lo que genera una respuesta al estrés y una reacción de detoxificación por parte de *Trichoderma*. Esquema tomado de Druzhinina *et al.*, 2011.

En conclusión, ha quedado demostrada la eficacia de *Trichoderma* en muchos casos concretos, lo que ha provocado que actualmente haya en el mercado más de 100 productos para su aplicación agrícola basados en *Trichoderma*, a pesar de las dificultades legales que surgen a la hora de registrar el producto y que varían enormemente entre un país y otro. Estas formulaciones pueden ser aplicadas de diferentes formas como la aplicación directa en suelo o semillas (“*coating*” o pildorado) o mediante diferentes sistemas de riego de las plántulas para el trasplante en semilleros o en cultivos definitivos (Cook, 1997).

Para conseguir una utilización más efectiva de los ACBs en el control de enfermedades de plantas, se debe entender primero cómo actúan y cuáles son sus límites para poder desarrollar mejores métodos de cultivo, almacenaje, aplicación y utilización de estos ACBs.

En el caso concreto de *Trichoderma*, los estudios de Genómica Funcional se están aplicando a la mejora de estos organismos beneficiosos. Actualmente, la selección de las cepas biocontroladoras más eficientes se está basando en (Lorito *et al.*, 2010):

- La identificación y caracterización de genes importantes para el biocontrol.
- El descubrimiento de metabolitos y de mecanismos ejercidos por *Trichoderma* en los que se basan sus efectos beneficiosos, controlando a los patógenos e induciendo el crecimiento y las defensas de las plantas.
- La caracterización de las repuestas fisiológicas de las plantas frente al tratamiento con *Trichoderma*.

Sin embargo, hay que ser cuidadosos a la hora de señalar a cierta cepa como buen ACB. Las enzimas y los antibióticos implicados en el biocontrol ejercido por *Trichoderma* se ven fuertemente influenciados por el sustrato, la temperatura y las condiciones en las que esté creciendo el hongo, ya que una cepa que se comporta como una excelente competidora en condiciones de laboratorio, puede no serlo en absoluto bajo las condiciones existentes en su nicho ecológico. **Todo esto ha llevado a la idea de que quizá, la mejor forma de obtener un buen ACB sea aislando las cepas de *Trichoderma* nativas de áreas geográficas específicas y testando en ellas su capacidad de biocontrol, basándose en los mecanismos descritos implicados en este proceso.**

2. El patógeno *Botrytis cinerea*.

B. cinerea es un hongo filamentoso fitopatógeno clasificado dentro de los ascomicetos. Aparece en todas las zonas climáticas en las que sus plantas huésped crecen, desde áreas tropicales y subtropicales hasta zonas frías. El amplio rango de condiciones climáticas que tolera se debe a su rápida tasa de germinación, infección, crecimiento del micelio y esporulación. Sus esporas necesitan una alta humedad para germinar y es muy activo como patógeno a temperaturas moderadas (Elad *et al.*, 2004). Una alta variación genotípica y fenotípica es común entre varias generaciones de *B. cinerea*, lo que le ayuda a adaptarse a condiciones adversas del ambiente, tanto climáticas como debidas a la presencia de fungicidas.

Se trata de un fitopatógeno necrotrófico con un amplio rango de plantas diana, siendo capaz de parasitar a más de 200 especies (cereales, uva, tomate, fresa, lechuga, alubia, etc.), produciendo la enfermedad conocida como “*podredumbre gris*” (MacFarlane, 1968), atacando preferentemente a frutos y flores, aunque también lo hace en tallos, hojas y semillas.

B. cinerea se destaca especialmente entre los hongos causantes de enfermedades en plantas ya que cada año provoca pérdidas millonarias: en los viñedos franceses causa unas pérdidas del 15-40% y en cultivos de fresa en España del 20-25% (Genoscope, 2005). El coste anual de los tratamientos contra este patógeno en España asciende a 3 millones de euros en tomate, 3 millones de euros en viña y 2 millones de euros en fresa (Fernández, 2006). Esto hace que sean muchos los esfuerzos por intentar controlar las plagas provocadas por este devastador hongo.

2.1. El proceso infeccioso.

2.1.1. Penetración en la planta.

La penetración se produce después de la germinación de los conidios y la subsiguiente emisión del tubo germinativo. Es el proceso por el que se rompen las barreras externas de la planta que permitirá la entrada del hongo y la colonización de los tejidos vegetales. En el laboratorio es imprescindible la adición de nutrientes para el desarrollo del apresorio.

- **Rotura de la cutícula.** La cutícula es la primera barrera de la planta que debe superar el hongo para empezar el ciclo infeccioso. El hongo secreta sustancias sobre la superficie de la planta, generando un poro debajo del apresorio. El proceso de penetración de *B. cinerea* puede realizarse mediante acción mecánica, o bien, mediante la acción de enzimas (esterasas o cutinasas) y ROS (Tenberge, 2004).
- **Rotura de la epidermis.** Tras atravesar la cutícula se forma un engrosamiento que se encarga de secretar enzimas líticas y otros componentes que comienzan a difundir en el huésped. Es bien conocido que *B. cinerea* produce una serie de toxinas como el botridial, el dihidrobotridial y los botcinolidos (Duran-Patron *et al.*, 1999; Rebordinos *et al.*, 1996), cuya importancia se debe a la función que poseen en el desarrollo de las manchas necróticas. También

se ha descrito el papel de las poligalacturonasas que se requieren para la virulencia de *B. cinerea* (Prins *et al.*, 2000).

2.1.2. Invasión y colonización.

Una vez realizada la penetración, el hongo invade los tejidos subepidérmicos, intra e intercelularmente para establecer la infección. El hongo mata al tejido antes de entrar en contacto con él mediante la secreción de distintas sustancias como enzimas líticas, toxinas, ácido abscísico o ácido oxálico, entre otros factores. En los últimos años se han descrito distintas enzimas y metabolitos implicados en los procesos de virulencia, entre los que cabe destacar las poligalacturonasas, las pectín metilesterasas, las celulasas y las ciclofilinas (Fernández, 2006).

2.2. Factores de patogenicidad de *B. cinerea*.

Las infecciones causadas por *B. cinerea* se caracterizan por la destrucción rápida de los tejidos de la planta, mediante la maceración y la necrosis, y su posterior colonización (Fig. 40). Para ello emplea un gran número de factores de patogenicidad, como pueden ser enzimas líticas, ROS o toxinas. Los factores de patogenicidad (genes, proteínas o toxinas) son necesarios para el desarrollo de la enfermedad, pero no esenciales para que el hongo pueda completar su ciclo de vida *in vitro* (Idnurm y Howlett, 2001).



Figura 40. Lesiones provocadas por *B. cinerea* en fresa, en un racimo de uvas y en una hoja de tomate.

Así, en *B. cinerea* son importantes los genes implicados en la degradación de la cutícula y de la pared celular, en la formación de las estructuras de infección (como apresorios y haustorios), en la producción de toxinas o en la señalización intracelular, principalmente (Elad *et al.*, 2004):

- **Enzimas implicadas en señalización celular**, como la MAPK codificada por el gen *bmp1*. Mutantes que carecen de este gen son incapaces de penetrar en el tejido ni macerarlo (Zheng *et al.*, 2000).
- **Toxina botridial**. Es un sesquiterpeno tricíclico que induce clorosis y el colapso celular durante la infección de la planta. Sus genes de biosíntesis (genes *bot*) están agrupados en un *cluster*, que incluye *bot1*, *bot3*, *bot4* (P450 monooxigenasas), *bot2* (sesquiterpeno sintasa) y *bot5* (acetil trasferasa) (Pinedo *et al.*, 2008).
- **Enzimas degradadoras de la pectina**. Se han encontrado al menos 5 genes que codifican para endopoligalacturonasas. Mutantes que carecen del gen *bcp1* son menos virulentos frente a hojas de tomate que la cepa silvestre (ten Have *et al.*, 1998).
- **Transportadores ABC**. El gen *bcatrB* codifica para un transportador ABC que confiere una mayor resistencia a la fitoalexina resveratrol, por lo que ayuda al patógeno a escapar de las defensas de la planta (Schoonbeek *et al.*, 2001).
- **Enzimas de detoxificación de ROS**. La enzima superóxido dismutasa (codificada por el gen *bcsod1*) ayuda al hongo a detoxificar las ROS producidas por la planta en un intento por frenar la infección (Rolke *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

- ✎ Obtener y caracterizar mutantes de la cepa Ta37 no productores de HA.
- ✎ Estudiar las alteraciones genéticas generadas en estos mutantes tanto en la ruta de biosíntesis de los trichotecenos como en la ruta de los terpenos.
- ✎ Evaluar la capacidad de antagonismo frente a diversos hongos fitopatógenos de la cepa Ta37 y de los mutantes no productores de HA.
- ✎ Determinar las relaciones que se establecen entre *Trichoderma* y *Botrytis cinerea* durante el proceso de micoparasitismo.

RESULTADOS

Con el fin de estudiar el papel del HA en la actividad micoparasítica de Ta37, se planteó la obtención de mutantes no productores de dicho trichoteceno. Inicialmente se diseñaron experimentos para silenciar el gen *tri4* de Ta37 ya que, de los genes estructurales de la ruta, es el que se expresa a un mayor nivel por lo que su silenciamiento podría tener un efecto drástico sobre el resto de la ruta, aparte de ser uno de los que codifica para una enzima con una actividad diferente a la descrita en *Fusarium*. Sin embargo, debido a los resultados obtenidos (ver más adelante) se optó también por la estrategia de la interrupción de este gen y, posteriormente, del *tri5*, siendo este último un posible punto importante en la regulación de la ruta al ser el primer gen específico de la misma.

1. Silenciamiento e interrupción del gen *tri4* de Ta37.

1.1. Silenciamiento del gen *tri4* en Ta37.

1.1.1. Obtención de los transformantes de Ta37 silenciados en el gen *tri4*.

Para la obtención de transformantes de Ta37 silenciados en el gen *tri4*, se construyó el plásmido pURS4 (ver materiales y métodos, apartado 2.3.) con el que se pretendía transformar dicha cepa. Brevemente, se construyó un casete de silenciamiento del gen *tri4* formado por 2 copias de un fragmento de 554 pb de dicho gen (obtenido mediante su digestión con las endonucleasas *Bam*HI y *Sac*I) en orientaciones opuestas, separadas por un intrón de 150 pb. Dicho casete se encuentra bajo el control del promotor del gen *tss1* de *T. harzianum* y del terminador del gen *cbh2* de *T. reesei*, y fue subclonado en el plásmido pUR5750 que confiere resistencia a higromicina B en hongos filamentosos y contiene los fragmentos RB y LB, gracias a los cuales es posible la transferencia del casete a Ta37 mediante la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. De este modo se obtuvo el plásmido pURS4 de 17,7 Kb.

La transformación de Ta37 con el vector pURS4 mediante *A. tumefaciens* se llevó a cabo según el protocolo descrito en el apartado 9.2.1. de materiales y métodos (Fig. 41). Tras 2 rondas de selección en medio TSA suplementado con 100 µg/ml de higromicina B, se seleccionaron 10 transformantes para estudios posteriores.

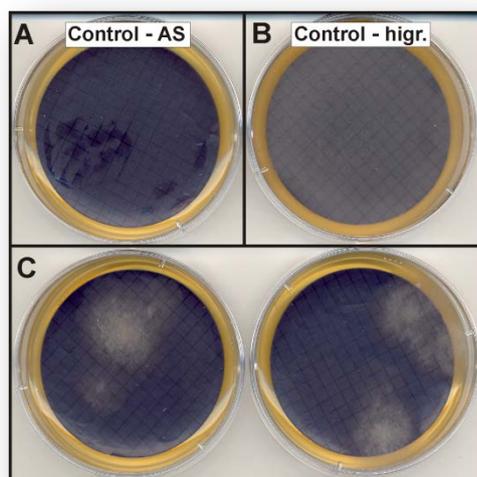


Figura 41. Transformación de Ta37 con el plásmido pURS4 mediante *A. tumefaciens*. A) Placa control sin acetosiringona (AS) (Medio TSA + 100 µg/ml de higromicina B; al no estar presente la AS no se lleva a cabo la transformación). B) Placa control sin el antibiótico higromicina B (medio TSA + 200 µM de AS; al no haber presión selectiva, crece un césped de micelio). C) Placas de TSA + 100 µg/ml de higromicina B + 200 µM de AS en las que se aprecian colonias transformantes.

1.1.2. Comprobación de los transformantes de Ta37 silenciados en el gen *tri4*.

Diez transformantes resistentes a higromicina B transformados con el plásmido pURS4, seleccionados al azar, fueron analizados mediante una hibridación tipo Southern de sus ADNs totales digeridos con las enzimas *SacI* y *BglII*. Se utilizó una sonda de 554 pb correspondiente a un fragmento interno del gen *tri4*, obtenida mediante la digestión de este gen con las enzimas *SacI* y *BamHI* (nótese que este fragmento de ADN se corresponde con el empleado en la construcción del *casete* de silenciamiento del gen *tri4*). El patrón de bandas de hibridación positivas esperado consistiría en 2 bandas, una de 3,1 Kb y otra de 1,4 Kb (Fig. 42.A). De este modo se seleccionaron los transformantes 1, 3, 4, 5, 6 y 9. En una transformación mediada por *A. tumefaciens* solamente se debería transferir la región T-DNA del plásmido, por lo que el mismo filtro empleado para la hibridación anterior se reutilizó e hibridó de nuevo con una sonda de 7,9 Kb correspondiente a la región “no T-DNA” del plásmido pUR5750. Tres de los transformantes (2, 3 y 4) dieron una banda positiva de hibridación (Fig. 42.B) indicando que en ellos se había transferido el plásmido completo y, por lo tanto, fueron descartados. Teniendo en cuenta los resultados de ambas hibridaciones se seleccionó el transformante TaS4-9.

La cepa TaS4-9 se creció en PDBs y los caldos de cultivo fueron analizados a lo largo del tiempo mediante HPLC analítica con el fin de determinar la eficacia del silenciamiento, que se vería reflejada en una menor producción de HA e incluso en la falta total de síntesis de este compuesto. Así se determinó que, aunque la producción de HA disminuía en esta cepa con respecto a la silvestre, esta disminución era muy pequeña entre las 48 y las 72 h, e incluso a las 24 y a las 96 h no se apreciaban diferencias significativas entre las cepas

(Tabla 11). Debido a los pobres resultados obtenidos con el silenciamiento del gen *tri4*, se optó por cambiar de estrategia y llevar a cabo la interrupción de este gen.

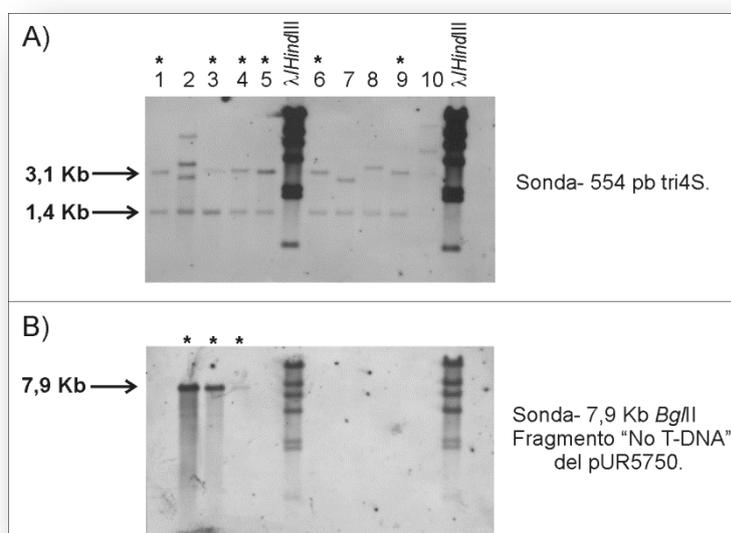


Figura 42. Experimentos tipo Southern para la comprobación de los transformantes silenciados en el gen *tri4*. A) El ADN genómico de los diferentes mutantes fue digerido con las enzimas *SacI* y *BglII* e hibridado con un fragmento interno de 554 pb del gen *tri4*. B) Los ADNs anteriores fueron hibridados con la sonda “no T-DNA” obtenida a partir de la digestión con *BglII* del plásmido pUR5750. Los asteriscos señalan los transformantes con el patrón de bandas esperado.

1.2. Interrupción del gen *tri4* en Ta37.

1.2.1. Obtención de transformantes de Ta37 interrumpidos en el gen *tri4*.

Con el fin de interrumpir el gen *tri4* en la cepa Ta37 se diseñó el plásmido p Δ Tri4, formado por un fragmento de 777 pb de dicho gen, obtenido mediante PCR, fusionado con el gen de resistencia a higromicina B y clonado en el vector pCR4[®] Blunt TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) (La construcción detallada de este plásmido se recoge en el apartado 2.3. de materiales y métodos).

El plásmido p Δ Tri4 se utilizó para transformar protoplastos de Ta37 empleando un protocolo optimizado en nuestro laboratorio a partir del método descrito para *F. graminearum* por McCormick y colaboradores (McCormick *et al.*, 2010). La principal modificación del método consistió en el aumento del tiempo de tratamiento del micelio de Ta37 con el cóctel de enzimas líticas hasta las 20 h (apartado 9.2.2. de materiales y métodos). Tras 2 rondas de crecimiento bajo la presión selectiva ejercida por el antibiótico higromicina B, se seleccionaron 150 transformantes para estudios posteriores.

1.2.2. Comprobación de los transformantes de Ta37 interrumpidos en el gen *tri4*.

En el *screening* inicial de los 150 transformantes resistentes a higromicina B se empleó el protocolo del kit Terra™ PCR, utilizando el par de oligonucleótidos Tri437-5 / Tri437-3b. En este experimento, en la cepa silvestre se amplificaron 1,8 Kb mientras que en un mutante interrumpido en el gen *tri4*, el fragmento sería de 9,1 Kb. El ADN total de los mutantes que mostraron el patrón de bandas deseado durante la PCR se digirió con la enzima *Bam*HI y se hibridó con una sonda de 777 pb correspondiente al fragmento interno del gen *tri4* utilizado en la construcción del vector pΔTri4. Las bandas de hibridación positiva tendrían un tamaño de 7,5 Kb en el caso de la cepa silvestre y de 14,8 Kb en el mutante TaΔTri4 (Fig. 43). Solamente el transformante #76 dio el patrón de bandas deseado.

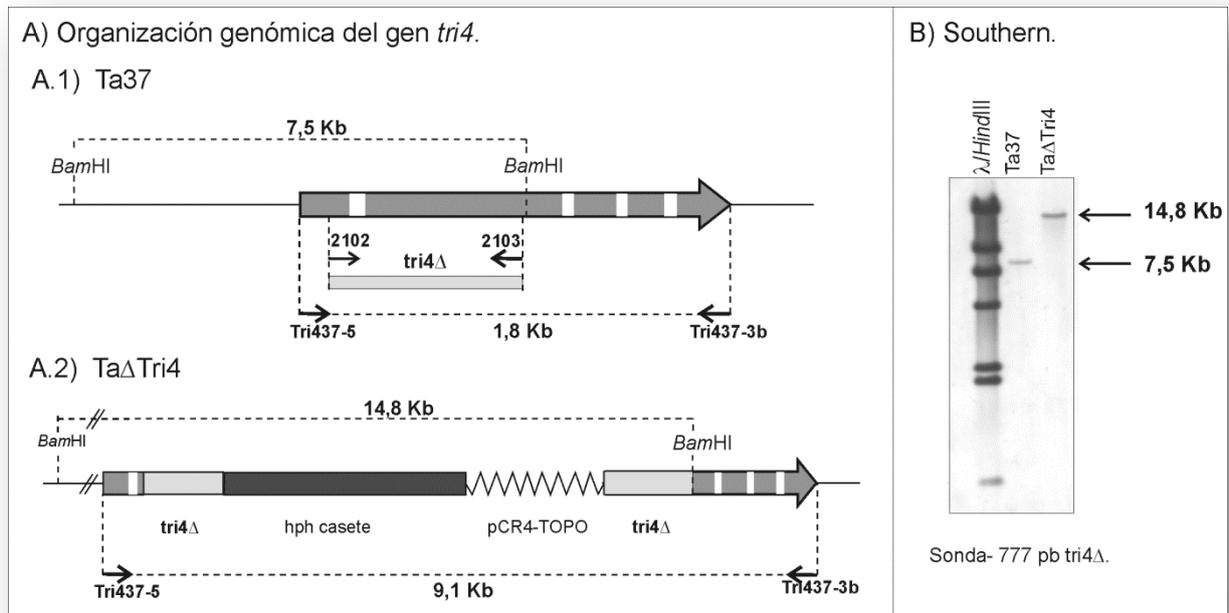


Figura 43. Experimentos de tipo Southern para comprobar la interrupción del gen *tri4*. A) Se muestra un esquema de la organización genómica del gen *tri4* tanto en la cepa silvestre (A.1) como en el mutante TaΔTri4 (A.2). B) El ADN genómico de la cepa silvestre y del mutante (TaΔTri4), digeridos con *Bam*HI, fueron hibridados con un fragmento interno del gen *tri4* de 777 pb.

El análisis del sobrenadante de cultivos de la cepa TaΔTri4 mediante HPLC reveló la presencia de trazas de HA por lo que, aunque se consiguió una reducción casi total en cuanto a la producción de HA, no se consiguió el bloqueo de su ruta de biosíntesis.

	HA ($\mu\text{g HA / ml sobrenadante / mg PS}$)		
	Ta37	TaS4-9	Ta Δ Tri4
24 h	18,60 ^a \pm 0,35	18,22 ^a \pm 1,61	0,00 ^b \pm 0,00
48 h	18,28 ^a \pm 0,50	12,98 ^b \pm 0,10	0,00 ^c \pm 0,00
72 h	14,76 ^a \pm 0,67	12,85 ^b \pm 0,50	0,00 ^c \pm 0,00
96 h	10,38 ^a \pm 0,78	10,38 ^a \pm 1,28	0,00 ^b \pm 0,00

Tabla 11. Producción específica de HA en cultivos en PDBs de las diferentes cepas de Ta37. Se muestra la producción de HA medida como microgramos de HA por mililitro de sobrenadante analizado por miligramo de peso seco (PS), y la desviación estándar de 3 mediciones independientes (n=3). Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,001).

2. Interrupción del gen *tri5* de Ta37.

2.1. Obtención de transformantes de Ta37 interrumpidos en el gen *tri5*.

Para llevar a cabo la interrupción del gen *tri5* en Ta37 se construyó el vector p Δ Tri5 mediante la clonación en el plásmido pCR4[®] Blunt TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) de un fragmento interno del gen *tri5* de Ta37 de 784 pb fusionado con el gen de resistencia a higromicina B (ver materiales y métodos 2.3.).

Con este vector se transformaron protoplastos de la cepa Ta37 (Fig. 44) y se seleccionaron 200 transformantes resistentes a higromicina B para posteriores análisis.

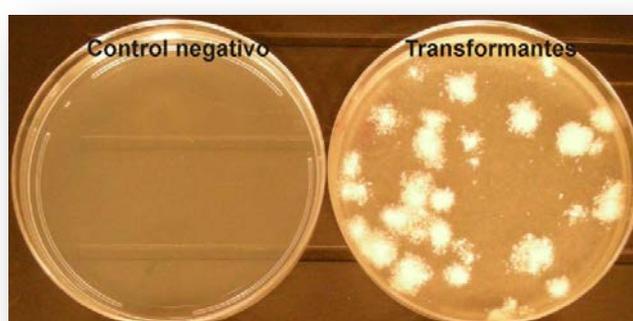


Figura 44. Transformación de protoplastos de Ta37 con el plásmido p Δ Tri5. Placas PDA + 100 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B.

2.2. Comprobación de los transformantes.

La interrupción del gen *tri5* en los transformantes resistentes a higromicina B se comprobó inicialmente realizando un estudio de PCR mediante el protocolo de extracción rápida de ADN del kit de la polimerasa Terra™ (ver materiales y métodos 7.2.9.1.), empleando los pares de oligonucleótidos 2114 / 2115 y 2114 / T7. Utilizando el primer par de cebadores, en la cepa silvestre se amplificaría una banda de 1,2 Kb, mientras que en un transformante positivo lo haría una de 8,5 Kb, sin embargo, debido a las condiciones de tiempo de extensión en las que se realizó la PCR, en una cepa interrumpida en el gen *tri5* no se amplificaría ningún fragmento. Empleando el par de oligonucleótidos 2114 / T7, solamente en los transformantes positivos se amplificaría un fragmento de 0,9 Kb correspondiente a parte del gen *tri5* y a parte del vector pCR4® Blunt TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA). De los 200 transformantes analizados, el #182 fue el único que mostró el patrón correcto de amplificación de bandas por PCR utilizando ambos pares de oligonucleótidos (Fig. 45).

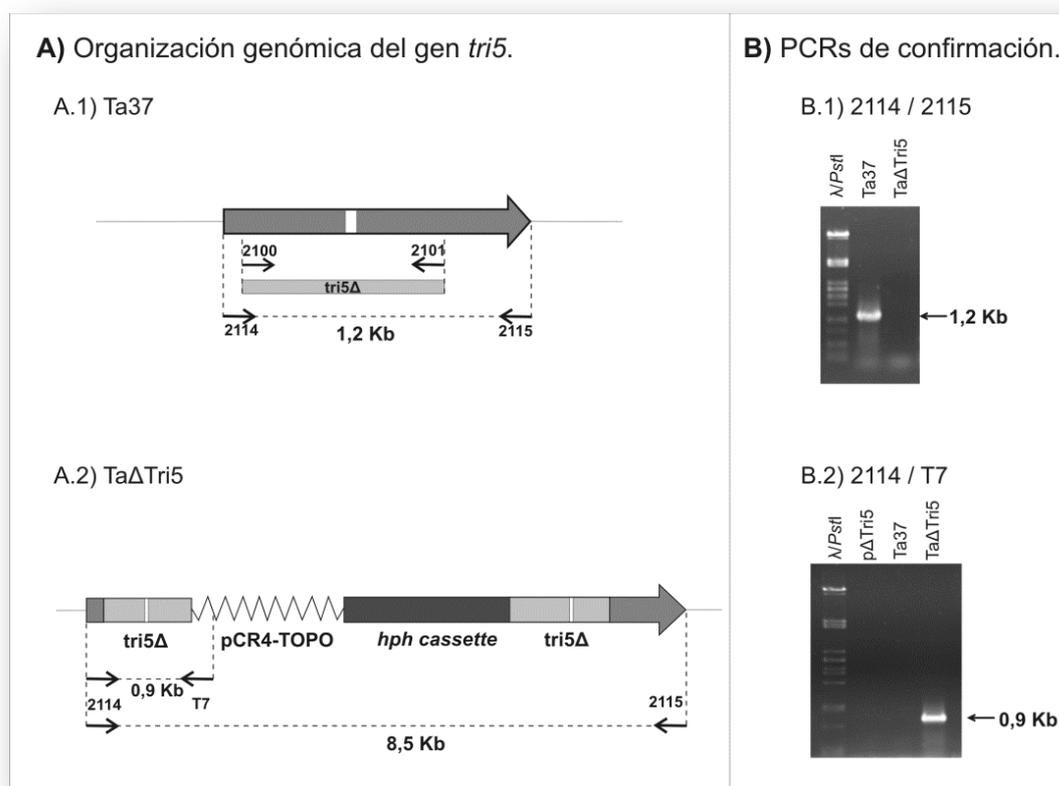


Figura 45. Análisis mediante PCR del transformante TaΔTri5. A) Organización genómica del gen *tri5* en Ta37 (A.1) y en el mutante TaΔTri5 (A.2). Se muestra la posición de los oligonucleótidos empleados en los análisis de PCR y los tamaños obtenidos durante la amplificación, así como el fragmento empleado para la construcción del plásmido pΔTri5. B) Experimentos de PCR para confirmar la interrupción del gen *tri5* en la cepa TaΔTri5, empleando el par de oligonucleótidos 2114 / 2115 (B.1) o 2114 / T7 (B.2).

Una vez seleccionado el mutante #182, se confirmó inequívocamente su condición de cepa interrumpida en el gen *tri5* mediante un experimento de Southern hibridando su ADN total y el de la cepa silvestre, ambos digeridos con la enzima *PvuII*, con una sonda de 0,6 Kb correspondiente a parte del promotor y al inicio de dicho gen. El ensayo se diseñó de tal modo que la hibridación de estos ADNs totales con la sonda de 0,6 Kb diera como resultado una banda de hibridación de 4,9 Kb en la cepa silvestre Ta37 y una de 4,8 Kb en el mutante Ta Δ Tri5 (Fig. 46).

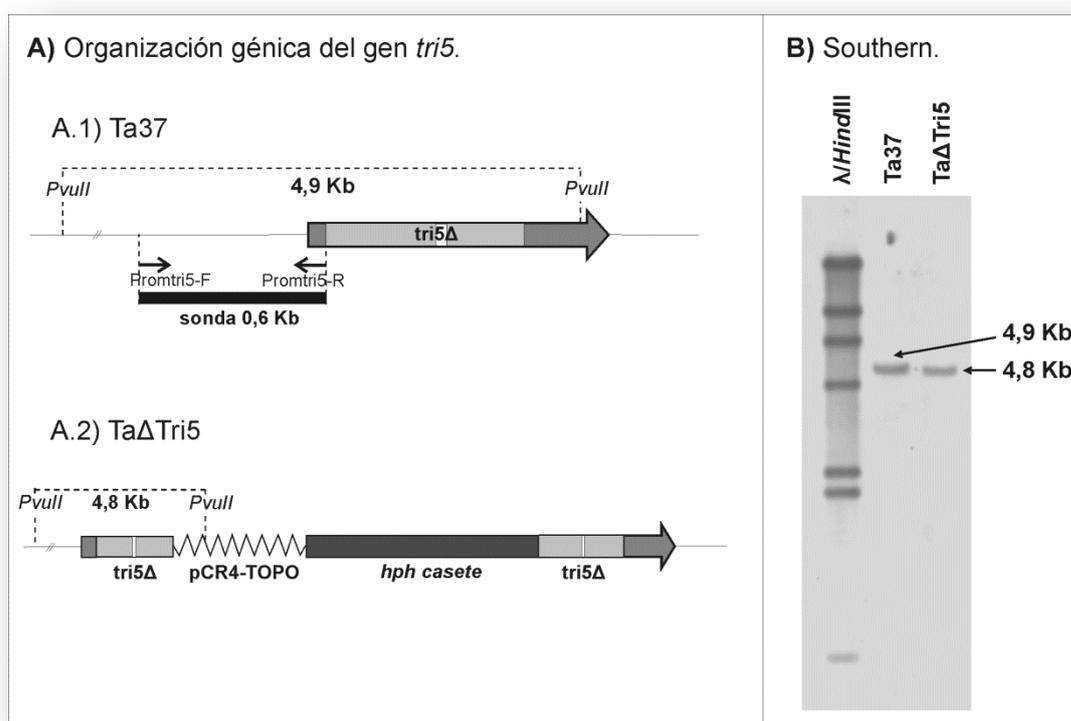


Figura 46. Confirmación del transformante Ta Δ Tri5 mediante southern. A) Organización génica del gen *tri5* en la cepa Ta37 (A.1) y en el mutante Ta Δ Tri5 (A.2). Se muestran las enzimas de restricción empleadas en el experimento de southern, así como el tamaño de los fragmentos obtenidos tras la digestión y la sonda utilizada. B) Southern de confirmación del transformante Ta Δ Tri5.

La cepa Ta Δ Tri5 se creció en medio PDBs con la finalidad de recoger el sobrenadante, llevar a cabo la extracción con acetato de etilo y su posterior análisis mediante HPLC analítica en busca de HA. Es de destacar que ni en muestras concentradas 5 veces se detectó la producción de HA, ni siquiera trazas del compuesto (Fig. 47), quedando así demostrada la naturaleza de la cepa Ta Δ Tri5 como interrumpida en el gen *tri5* y no productora del trichoteceno HA.

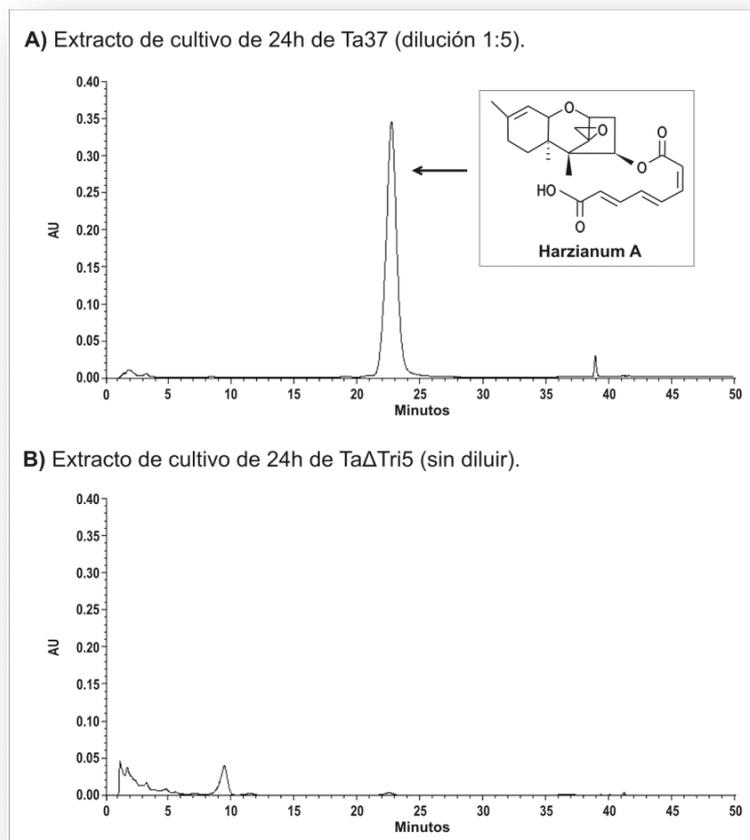


Figura 47. Cromatogramas de extractos de cultivos de 24 h en PDBs de las cepas Ta37 (A) y Ta Δ Tri5 (B) obtenidos mediante HPLC analítica.

2.3. Complementación del mutante Ta Δ Tri5.

Con el fin de determinar si la producción de HA se restablecía en el mutante Ta Δ Tri5 al introducir una copia funcional de gen *tri5*, dicha cepa fue transformada con el plásmido pUStri5 (ver materiales y métodos 2.3.) mediante conjugación llevada a cabo por *A. tumefaciens*. De este modo se obtuvieron 52 transformantes resistentes a 25 μ g/ml de higromicina B y a 100 μ g/ml de fleomicina, de los cuales se analizaron del 1 al 25 mediante PCR con el par de oligonucleótidos 2114 / pAN52- *trpC*, esperándose la amplificación de una banda de 2 Kb en los transformantes positivos. Todos los transformantes analizados, excepto el 3, presentaron el patrón de bandas deseado y se seleccionaron 10 de ellos (del 15 al 24) para su cultivo en medio líquido para cuantificar la producción de HA a las 24h.

De los 10 transformantes analizados, 2 de ellos (Δ Tri5+*tri5*-17 y 18) produjeron pequeñas cantidades del trichoteceno, mientras que el mutante Δ Tri5+*tri5*-15 produjo una importante cantidad de HA (Tabla 12), cercana al nivel de producción de HA de la cepa silvestre.

Cepa	HA ($\mu\text{g HA / ml sobrenadante / mg PS}$)
Ta37	18,60 \pm 0,35
$\Delta\text{Tri5+tri5-15}$	14,78 \pm 0,90
$\Delta\text{Tri5+tri5-16}$	-
$\Delta\text{Tri5+tri5-17}$	0,240 \pm 0,09
$\Delta\text{Tri5+tri5-18}$	0,249 \pm 0,14

Tabla 12. Producción de HA por parte de los mutantes Ta ΔTri5 transformados con el plásmido pUStri5. La producción se expresa como $\mu\text{g HA / ml sobrenadante / mg peso seco}$.

Se hibridó el ADN de los transformantes $\Delta\text{Tri5+tri5-15}$, 16, 17 y 18, digeridos con la enzima *PvuII*, con la sonda term-*tri5* (1,2 Kb) obtenida mediante PCR empleando como molde el plásmido pUStri5 y los oligonucleótidos pAN52-*trpC* y Tri5-839. En todos los transformantes analizados se observó el patrón de bandas esperado en una integración ectópica (bandas de 1,3 y 1,5 Kb), apareciendo una banda adicional en el mutante $\Delta\text{Tri5+tri5-15}$ de 4,9 Kb, correspondiente a la sustitución del gen *tri5* truncado del mutante Ta ΔTri5 por una copia funcional de dicho gen presente en el plásmido pUStri5 (Fig. 48).

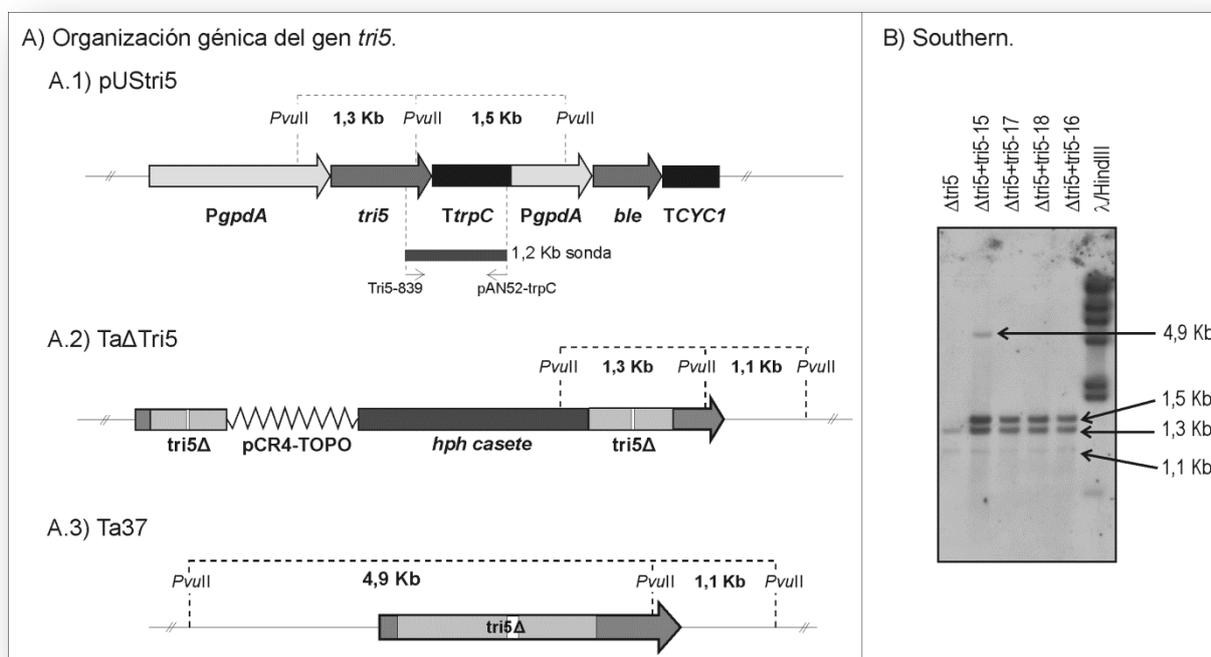


Figura 48. Confirmación de los transformantes de Ta ΔTri5 complementados con el plásmido pUStri5 mediante southern. A) Estructura de la región que incluye al gen *tri5* en el plásmido pUStri5 (A.1), en Ta ΔTri5 (A.2) y en la cepa Ta37 (A.3). Se muestran los oligonucleótidos empleados para obtener la sonda así como sitios de restricción importantes para el análisis. B) Resultado de la hibridación con la sonda de 1,2 Kb del ADN de Ta ΔTri5 y de 4 de los transformantes digeridos con la enzima *PvuII*.

3. Caracterización de los transformantes obtenidos.

3.1. Producción de metabolitos derivados de la ruta de biosíntesis de HA.

La producción de intermediarios de la ruta de síntesis del HA fue estudiada en los transformantes TaS4-9 y Ta Δ Tri4 debido a que, especialmente en el caso del mutante interrumpido, se detectó una inesperada producción de pequeñas cantidades de HA. Mediante GC-MS se analizaron sobrenadantes de cultivos de ambas cepas, extraídos con acetato de etilo a lo largo del tiempo, desde las 24 hasta las 96 h. En ninguno de los caldos estudiados se detectó acumulación de trichodieno, hecho esperado al tratarse del sustrato de la enzima Tri4, enzima que, o no debería estar siendo producida o lo debería estar haciendo a muy bajo nivel en los transformantes. Sin embargo, en los cromatogramas generados por el análisis de los cultivos de ambos transformantes se observaba un pico nuevo a los 9,3 min que no aparecía en la cepa silvestre (Fig. 49), y cuyo espectro de masas, aunque similar, no se correspondía con el del trichodieno. Mediante los métodos de GC empleados en este trabajo no era posible detectar el HA aunque sí el trichodermol, intermediario inmediato a la formación del HA (Fig. 49.D), pero este compuesto tampoco aparecía en los caldos de los transformantes TaS4-9 ni Ta Δ Tri4. Entonces, si en ninguno de los transformantes se estaba acumulando trichodieno y no se detectaba trichodermol, ¿cómo ocurría la síntesis de HA?

Con el fin de determinar si esta ruta alternativa de biosíntesis del HA y la aparición de un nuevo pico cromatográfico a los 9,3 min eran fruto de otras modificaciones genéticas (diferentes a las propias generadas en el gen *tri4*) sufridas por las cepas en el momento de su transformación con los plásmidos pURS4 o p Δ Tri4, se analizaron mediante GC-MS cultivos de la cepa Ta37 tratados con xantotoxina. Este compuesto está descrito como un potente inhibidor de las P450 monooxigenasas (Alexander *et al.*, 2008) y, por lo tanto, de la enzima Tri4, de modo que el tratamiento de la cepa silvestre con la xantotoxina produciría un efecto análogo a lo que estaba sucediendo en los mutantes TaS4-9 y Ta Δ Tri4. El estudio mediante GC-MS de caldos de cultivos de la Ta37 tratados con 0,1 mM de xantotoxina reveló un patrón cromatográfico idéntico al mostrado por los transformantes ya que no se apreciaba el acúmulo de trichodieno ni la presencia de trichodermol, pero sí aparecía el compuesto nuevo a los 9,3 min, poniendo de manifiesto la existencia en la especie Ta37 de una ruta alternativa hacia la producción de HA cuando se bloqueaba la actividad de la enzima Tri4.

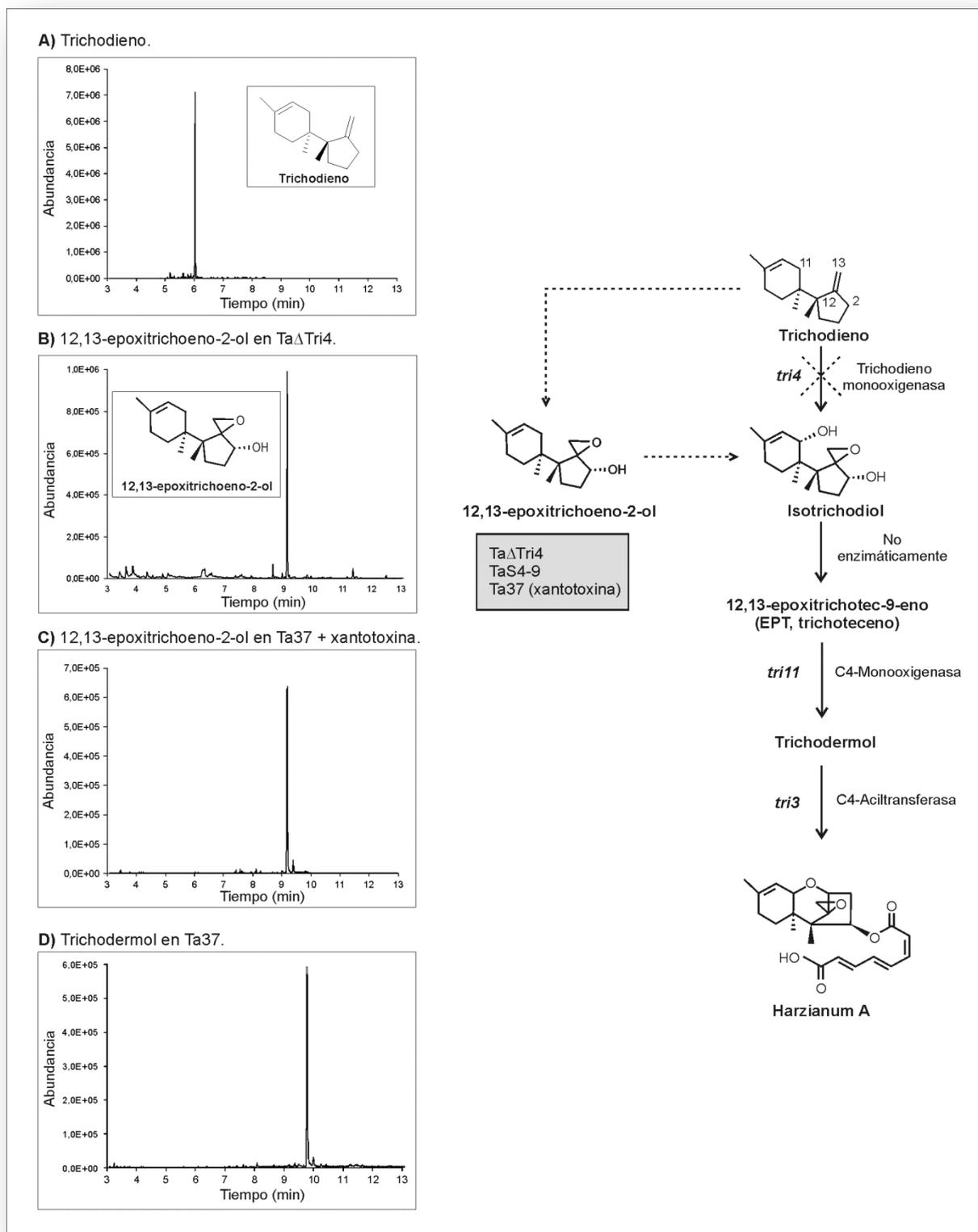


Figura 49. Izquierda: Cromatogramas obtenidos mediante GC de un estándar de trichodieno (A), de caldo extraído de Ta Δ Tri4 (B), de caldo extraído de Ta37 tratado con xantotoxina (C) y de caldo extraído de Ta37 (D). Derecha: Esquema de la ruta de biosíntesis del HA. Las líneas discontinuas indican la producción de 12,13-epoxitrichoeno-2-ol a partir de trichodieno por las cepas indicadas en la caja gris.

El compuesto que aparecía a los 9,3 min en los cromatogramas de las cepas mutantes, así como otros 2 compuestos de bajo peso molecular que también se detectaban en la cepa Ta Δ Tri4 pero no en la silvestre, fueron purificados a partir de caldos concentrados de dicha cepa sometidos a cromatografía de adsorción en columna de sílica gel con una fase móvil compuesta por hexano-acetato de etilo (3:1). Los compuestos purificados fueron caracterizados mediante NMR (anexo 3) y GC-MS y, basándose en estos datos, el compuesto de los 9,3 min fue identificado inequívocamente como 12,13-epoxitrichoeno-2-ol. Los otros 2 compuestos minoritarios detectados fueron intuitivamente identificados como 12,13-epoxitrichoeno-2,8-diol y 12,13-epoxitrichoeno-2,16-diol. El compuesto principal, 12,13-epoxitrichoeno-2-ol, también se identificó en cultivos de la cepa TaS4-9 y de la Ta37 tratada con xantotoxina.

3.2. Estudio morfológico.

Los transformantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 se crecieron sobre distintos medios en paralelo con la cepa silvestre para determinar si presentaban diferencias fenotípicas con respecto a ésta. Se emplearon 2 medios complejos, PPG y PDA, y un medio mínimo, MMT, y el aspecto morfológico de las colonias se registró a los 6 días de incubación a 28°C (Fig. 50). En el medio PPG los mutantes presentaban una tasa de crecimiento similar a la cepa Ta37, aunque se observaba un retraso en la esporulación de ambos transformantes, siendo este retraso mucho más evidente en el caso de Ta Δ Tri5. Cuando las 3 cepas crecían sobre los medios PDA o MMT, la tasa de crecimiento de los 2 mutantes era mayor que la de la cepa silvestre, siendo esta diferencia más acusada al crecer sobre medio mínimo.

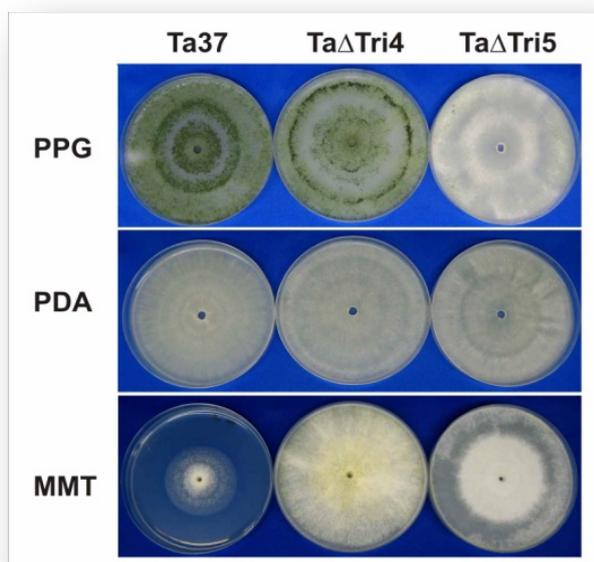


Figura 50. Crecimiento de las cepas Ta37, Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 sobre PPG, PDA y MMT tras 6 días de incubación a 28°C.

3.3. Estudio de la expresión de los genes *tri*.

Se quiso estudiar de qué manera la alteración de la ruta de biosíntesis del HA en los mutantes afectaba a la expresión del resto de los genes *tri*. Para ello se extrajo el ARN de la cepa Ta37 y de los transformantes TaS4-9, Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5, crecidos durante 24 h en medio PDBs. A partir de estos ARNs se sintetizaron sus correspondientes ADNc que fueron utilizados como molde en experimentos de PCR a tiempo real (qPCR) para el estudio de la expresión de los genes de la ruta.

En estos experimentos de qPCR se emplearon 2 genes de referencia o *housekeeping*, el gen de la α -actina y el gen *gpd* (seleccionados con ayuda del software GeNorm), sobre los que se normalizaron los datos de expresión del resto de genes objeto de estudio. De este modo se obtuvo la expresión relativa de los genes en una cepa problema (cualquiera de los mutantes) frente a la expresión de los genes en una cepa control (en este caso la Ta37). Cada una de las mediciones fue realizada por triplicado y para cada par de oligonucleótidos empleado se obtuvo el valor de eficiencia de la reacción (*E value*) mediante la confección de una recta patrón, estando en todos los casos este valor entre el 91 y el 106%. Todos los datos obtenidos durante los experimentos de qPCR así como los valores de eficiencia para cada par de oligonucleótidos fueron analizados mediante el software REST2009[®], obteniéndose la expresión relativa de los genes *tri* entre diferentes cepas y un estudio estadístico sobre esas diferencias.

La interrupción del gen *tri4* en la cepa Ta Δ Tri4 afectó negativamente a la expresión de los genes *tri4* y *tri5* ($p=0,00$) en comparación con la cepa Ta37, mientras que el nivel de expresión del resto de los genes se mantuvo sin cambios (Fig. 51.A). Nótese que el nivel de expresión del gen *tri4* en el mutante estaba por encima de 0 lo cual era debido al hecho de que los oligonucleótidos empleados para estudiar este gen se localizaban en el extremo 5' del gen, en un punto anterior al del lugar donde se insertaba el vector de interrupción. Además, tanto el promotor como el inicio del gen *tri4* estaban intactos por lo que la transcripción se debería iniciar con normalidad. Por otro lado, en el transformante TaS4-9 los genes *tri4*, *tri5*, *tri6* y *tri11* se veían reprimidos significativamente ($p=0,00$) con respecto a la cepa silvestre Fig. 51.B).

La expresión de todos los genes *tri* en el mutante Ta Δ Tri5, a excepción del gen *tri4*, se incrementó con respecto a Ta37. El mayor aumento en esta expresión se observó en los genes *tri11* y *tri3*, mostrando una relación en comparación con la cepa silvestre de 3,3 ($p=0,000$) y de 4,8 ($p=0,026$), respectivamente. El nivel de expresión del gen *tri5* pudo ser estudiado debido a las mismas razones expuestas para el mutante Ta Δ Tri4, obteniéndose

una ligera inducción en la expresión de este gen, siendo 1,581 veces mayor que en la cepa silvestre ($p=0,000$) (Fig. 51.C).

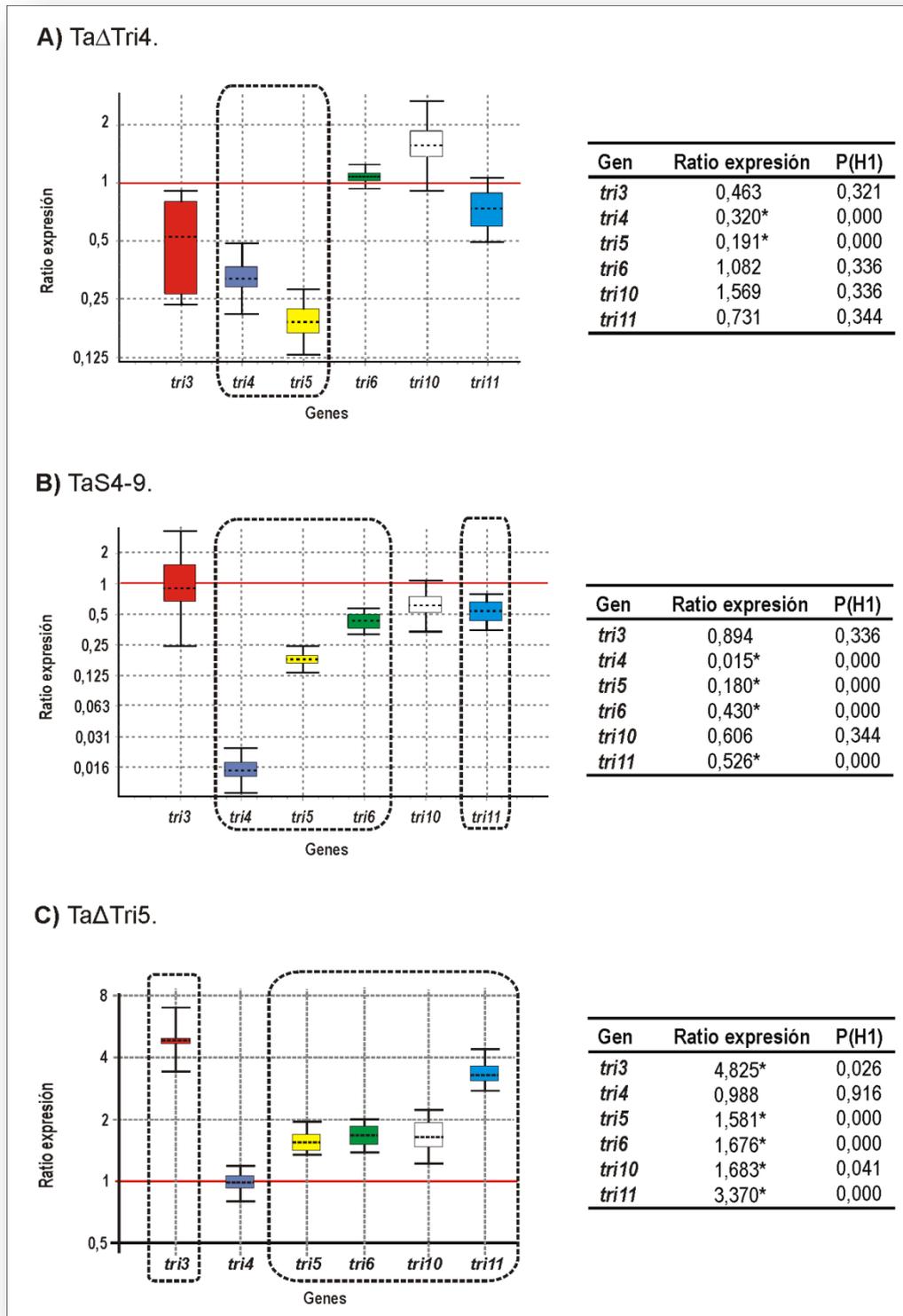


Figura 51. Análisis de la expresión de los genes *tri* en los transformantes Ta Δ Tri4 (A), TaS4-9 (B) y Ta Δ Tri5 (C) mediante el software REST2009. Los recuadros punteados y los asteriscos indican un nivel de expresión estadísticamente diferente al de la cepa Ta37 ($n=3$; $p<0,05$).

3.4. Producción de ergosterol y de escualeno.

Uno de los principales metabolitos derivados de la ruta de biosíntesis de los terpenos en hongos es el triterpeno ergosterol, compuesto que se encuentra formando parte de las membranas celulares de dichos organismos. Como se ha descrito anteriormente, en los transformantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 se había bloqueado, o al menos alterado, la ruta de biosíntesis del trichoteceno HA, por lo que se quiso determinar si este hecho provocaba un aumento en la síntesis de ergosterol en estas cepas debido a un posible acúmulo de FPP, compuesto en el que la ruta general de terpenos se desvía hacia la formación de HA o hacia la síntesis de triterpenos. Además del ergosterol, se quiso cuantificar la producción de escualeno, compuesto sintetizado a partir del FPP y que constituye el primer intermediario específico de la ruta de biosíntesis de triterpenos.

Se extrajeron los esteroides totales de micelios crecidos en PDBs durante 24 y 96 h y se midió en ellos la cantidad de ergosterol presente empleando un espectrofotómetro programado para hacer un barrido desde 200 hasta 300 nm de longitud de onda y aplicando las fórmulas descritas en materiales y métodos, apartado 16. De este modo se determinó que la producción de ergosterol era mayor en los transformantes que en la cepa silvestre, en los 2 tiempos estudiados, lo cual indicaba que el bloqueo en la ruta de síntesis de HA provocaba un aumento en la cantidad de ergosterol producido (Fig. 52). Con respecto a las cepas Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5, se apreciaron diferencias entre ambas, produciéndose mayor cantidad de ergosterol en la cepa Ta Δ Tri5, lo que estaría de acuerdo con el bloqueo total de la ruta de biosíntesis del HA en este mutante frente al bloqueo parcial que se daba en Ta Δ Tri4.

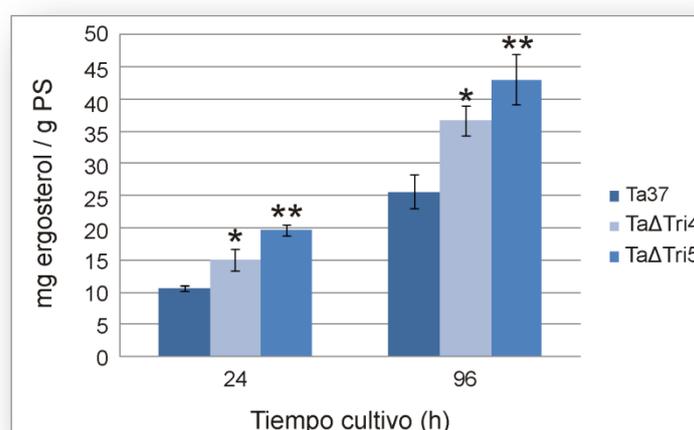


Figura 52. Producción de ergosterol a las 24 y 96 h por parte de la cepa silvestre y los mutantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5. Se indica la desviación estándar de cada medición (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la cepa Ta37 (Test U-Mann Whitney, p<0,05).

A partir de las mismas muestras empleadas para medir ergosterol, se midió en ellas la absorbancia a 216 nm y dicho dato se extrapoló en una recta patrón que relacionaba la cantidad de escualeno presente en una muestra con el valor de absorbancia (Fig. 53.A). De este modo se determinó que, de forma similar a lo que ocurría con el ergosterol, el escualeno se producía en mayor cantidad en los mutantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 que en la cepa silvestre a las 24 h, no apreciándose diferencias significativas entre los 2 mutantes. A las 96 h, el escualeno producido por la cepa Ta Δ Tri4 seguía siendo mayor que el de la Ta37, sin embargo, el mutante Ta Δ Tri5 producía una cantidad intermedia del compuesto que no permitió establecer diferencias significativas entre esta cepa y la Ta37 o la Ta Δ Tri4 (Fig. 53.B).

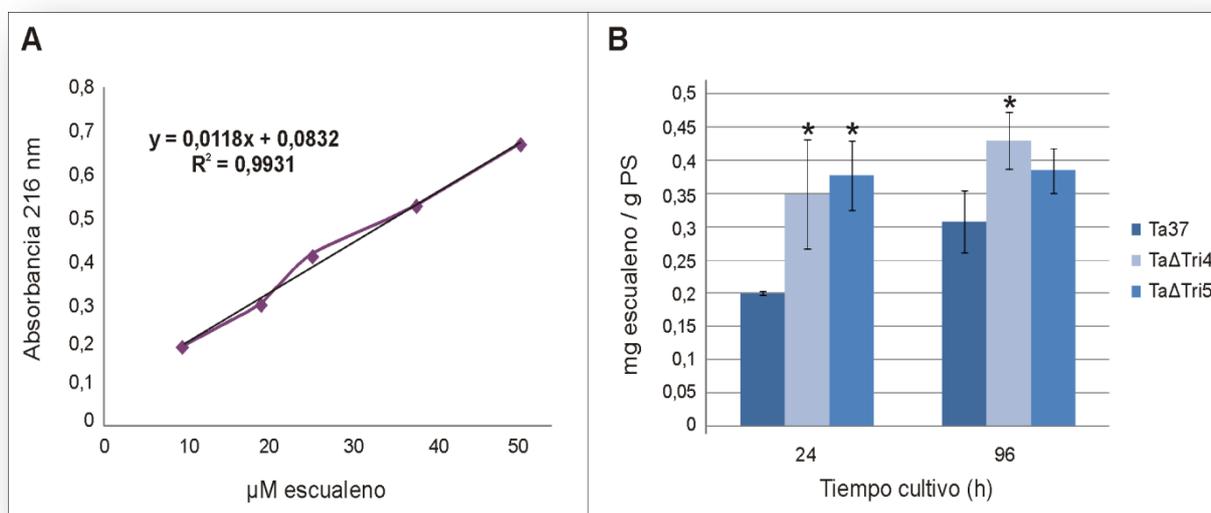


Figura 53. Cuantificación de escualeno. A) Recta patrón obtenida a partir de escualeno puro (Sigma, St. Louis MO) empleada para cuantificar el escualeno presente en una muestra. B) Producción de escualeno a las 24 y 96 h por parte de la cepa silvestre Ta37 y de los mutantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5. Se indica la desviación estándar de cada medición (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la cepa Ta37. (Test U-Mann Whitney, $p < 0,05$).

Estos datos indican que en las 2 cepas mutantes se estaba produciendo una mayor cantidad tanto de escualeno como de ergosterol probablemente como una vía de escape del FPP que se estaría acumulando al no poder ser canalizado hacia la síntesis de HA.

3.5. Estudio de la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de terpenos.

Se sabe que la ruta de biosíntesis de los terpenos es una vía muy regulada debido a que a partir de ella no sólo se sintetizan metabolitos secundarios sino también metabolitos primarios tan importantes como el ergosterol. La demostración de que en los mutantes en los que se había bloqueado la ruta de síntesis del HA se generaba más escualeno y más ergosterol nos llevó a plantearnos si esta modificación puntual generaría otro tipo de alteraciones a lo largo de la ruta general de terpenos. Para intentar responder a esta pregunta, se diseñaron experimentos de qPCR con el fin de estudiar el nivel de expresión de diversos genes de la vía de síntesis de terpenos (*hmgR*, *dpp1*, *erg1*, *erg7* y *erg9*; ver Fig. 54), tanto en la cepa Ta37 como en el mutante Ta Δ Tri5, a las 24 y a las 96 h. Para ello se diseñaron oligonucleótidos (anexo1) basados en zonas conservadas de dichos genes de varias cepas de *Trichoderma*, disponibles en las bases de datos. Así, se subclonaron y secuenciaron fragmentos internos de estos genes de síntesis de terpenos de la cepa Ta37 y, en base a la secuencia obtenida, se diseñaron oligonucleótidos para el estudio de su expresión mediante qPCR.

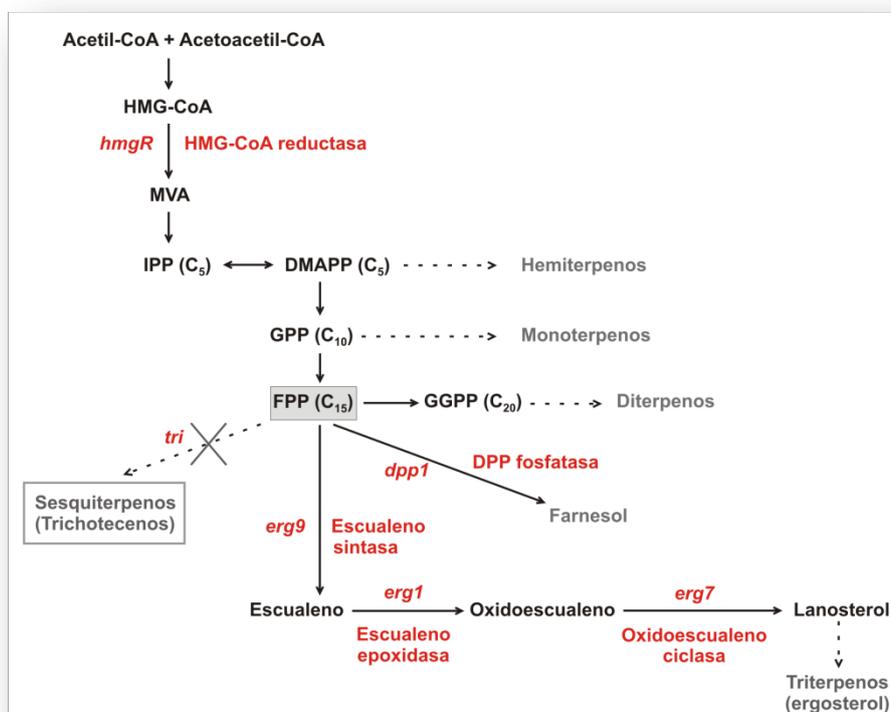


Figura 54. Esquema de la ruta de síntesis de terpenos en hongos. Se muestran los genes estudiados mediante qPCR a lo largo de este trabajo, así como las enzimas que codifican. DMAPP: dimetilalil pirofosfato; DPP: diacilglicerol pirofosfato; FPP: farnesil pirofosfato; GPP: geranyl pirofosfato; GGPP: geranylgeranyl pirofosfato; IPP: isopentenil pirofosfato; MVA: mevalonato; HMG-CoA: hidroximetilglutaril-CoEnzima A.

A las 24 h se observó en la cepa Ta Δ Tri5 una sobreexpresión de los genes *hmgR*, *dpp1* y *erg9*, siendo este nivel de expresión 3,927 ($p=0,036$), 3,877 ($p=0,012$) y 2,503 ($p=0,031$) veces mayor que en la cepa silvestre, respectivamente. Con respecto a los genes *erg1* y *erg7*, se observó una ligera sobreexpresión de ambos en la cepa mutante, aunque no fue estadísticamente significativa (Fig. 55.A) Sin embargo, cuando el análisis se realizó a partir de micelio tomado de un cultivo de 96 h, los genes *hmgR*, *erg1*, *erg7* y *erg9* estaban reprimidos en el mutante, expresándose 0,296 ($p=0,034$), 0,301 ($p=0$), 0,156 ($p=0$) y 0,505 ($p=0,038$) veces con respecto a la cepa Ta37, en cambio la expresión del gen *dpp1* no se veía significativamente afectada (Fig. 55.B).

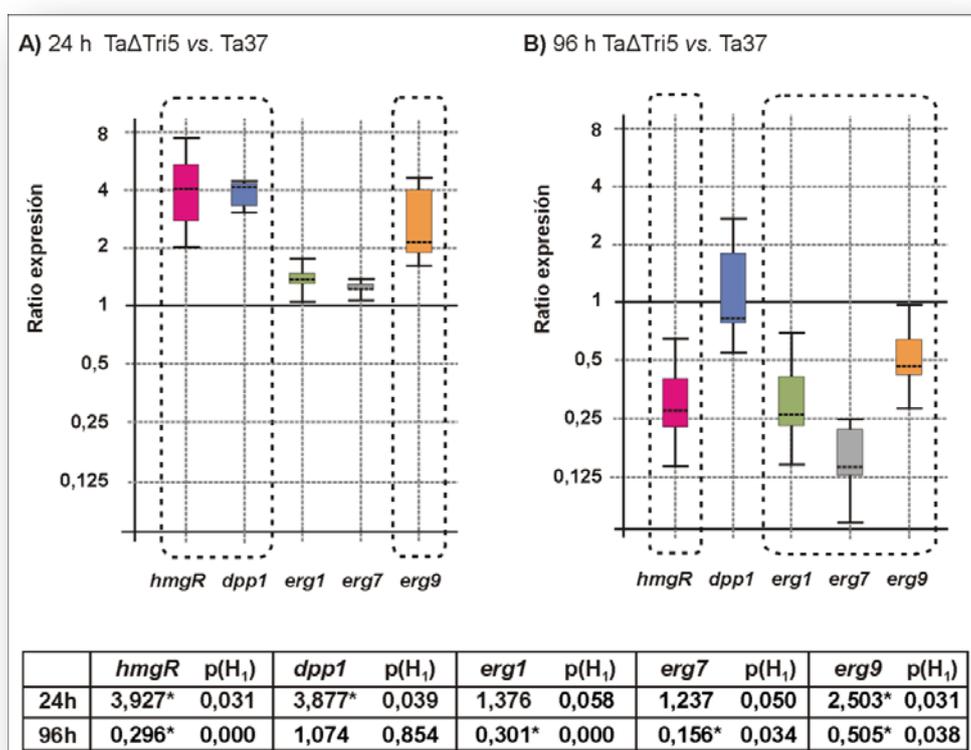


Figura 55. Estudio mediante qPCR de la expresión de varios genes implicados en la ruta de biosíntesis de terpenos en el mutante Ta Δ Tri5 con respecto a la cepa silvestre, a las 24h (A) y a las 96 h (B). Los recuadros punteados indican diferencias significativas entre ambas cepas ($p<0,05$).

3.6. Estudio de la actividad HMG-CoA reductasa.

Con el fin de determinar si la interrupción del gen *tri5* en Ta37 afectaba al balance total de la ruta de biosíntesis de terpenos, y como complemento al estudio de expresión de los genes *hmgR*, *dpp1*, *erg1*, *erg7* y *erg9* (ver apartado anterior), se cuantificó la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa a las 24 y a las 96 h de crecimiento. Dicha enzima cataliza la

síntesis de mevalonato a partir de HMG-CoA y está estrictamente regulada a varios niveles. Cabría esperar una variación en la actividad de la HMG-CoA reductasa si la falta de procesamiento del FPP hacia la formación de HA en la cepa Ta Δ Tri5 tuviera como consecuencia el acúmulo de esteroides y/u otros compuestos terpenoides.

Mediante un ensayo basado en el cambio de absorbancia a 340 nm de longitud de onda que experimenta una muestra al producirse la oxidación del NADPH, se calculó la actividad HMG-CoA reductasa específica, expresándola como nmoles de NADPH oxidado por minuto y por mg de proteína. El mutante Ta Δ Tri5 mostró un incremento en la actividad HMG-CoA reductasa del 92,4% y del 23,9% en comparación con la cepa control a las 24 y a las 96 h, respectivamente (Tabla 13).

	24 h		96 h	
	Actividad	% variación	Actividad	% variación
Ta37	26,5 ^b ± 9,13	-	33,8 ^b ± 2,29	-
TaΔTri5	51,0 ^a ± 1,13	+ 92,4	41,9 ^a ± 2,52	+ 23,9

Tabla 13. Actividad específica HMG-CoA reductasa (nmoles NADPH/min/mg proteína total) en las cepas Ta37 y Ta Δ Tri5. Se muestran los datos obtenidos de 3 mediciones independientes (n=3). Los datos estadísticamente diferentes se indican con superíndices distintos (Test U-Mann Whitney).

4. Valoración de la capacidad antagonista de Ta37: papel del HA como antifúngico.

Una vez caracterizados los transformantes de Ta37 interrumpidos en los genes *tri4* y *tri5*, se llevaron a cabo diversos experimentos para estudiar la capacidad antagonista de la cepa Ta37 frente a diferentes hongos fitopatógenos de gran importancia en nuestro país, así como dilucidar si esta capacidad se veía reforzada por la producción de HA.

4.1. Ensayos duales de enfrentamiento.

En un primer momento se llevaron a cabo experimentos de enfrentamiento directo entre las cepas de *Trichoderma* y hongos filamentosos fitopatógenos tales como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sporotrichioides* y *Myrothecium roridum*. Para ello se

enfrentaron en una placa de PDA (excepto en el caso de *B. cinerea* en que la placa fue de MEA) un taco de agar de 5 mm de diámetro conteniendo micelio en crecimiento de una de las cepas de *Trichoderma* contra un taco de agar con micelio del patógeno, separados entre sí por 5 cm. Dichas placas se incubaron a 28°C y el crecimiento de cada una de las colonias fue monitorizado cada 24 h, con el fin de determinar si alguna de ellas detenía el crecimiento de la otra, o si llegaba a rodearla e incluso a crecer por encima (Fig. 56). Como control se prepararon placas con cada una de las cepas creciendo en solitario y placas de enfrentamiento de la cepa consigo misma a fin de descartar otras causas si el crecimiento se detenía al llegar a la zona de interacción entre ambas colonias.

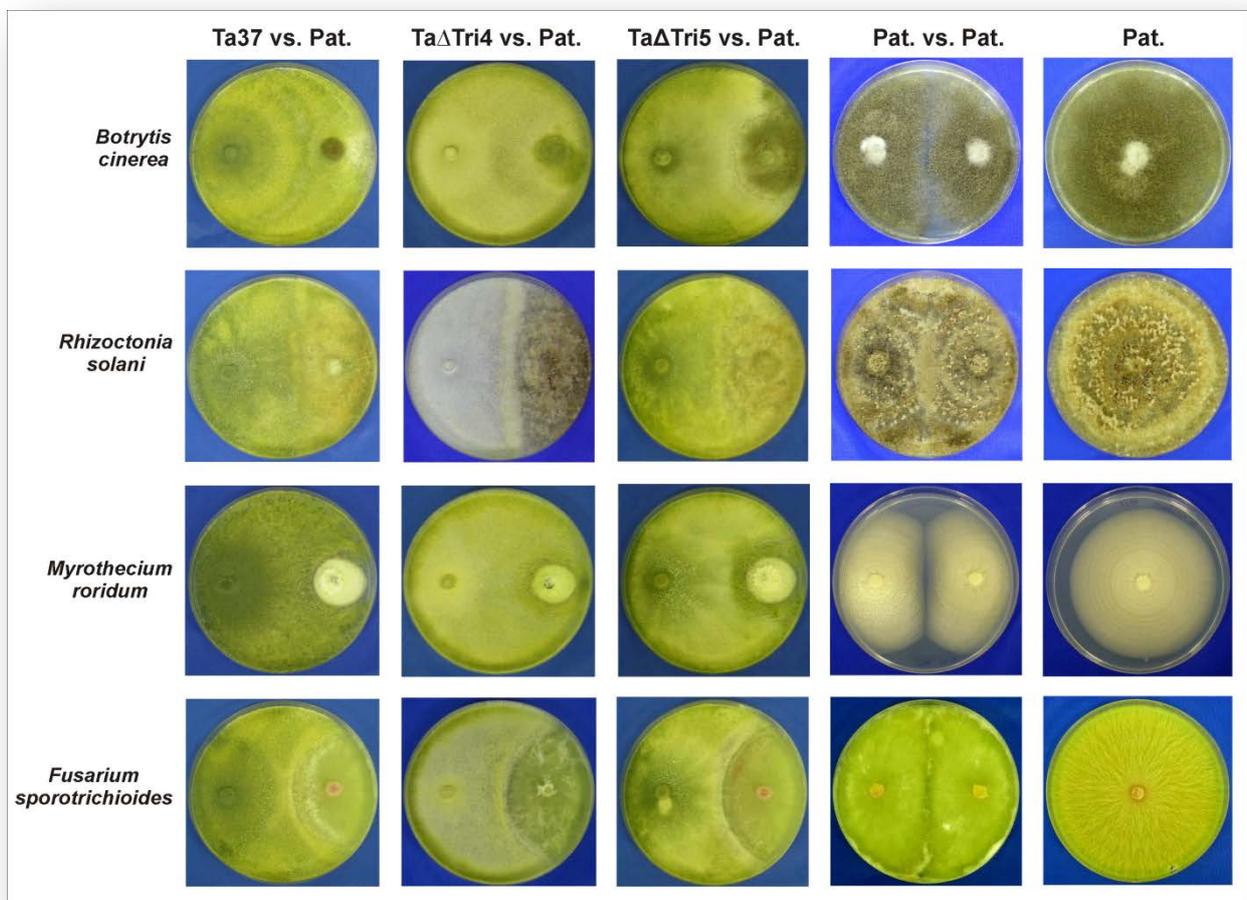


Figura 56. Ensayos duales de enfrentamiento de las diferentes cepas de *Trichoderma* frente (vs.) a los hongos patógenos (Pat.) *B. cinerea*, *R. solani*, *M. roridum* y *F. sporotrichioides*. Las fotografías fueron tomadas tras 10 días de incubación a 28°C.

En todos los casos los patógenos ocuparon completamente las placas control de PDA o MEA. En las placas de enfrentamiento se pudo observar que tanto la cepa silvestre como los mutantes TaΔTri4 y TaΔTri5 fueron capaces de inhibir el crecimiento de los 4 hongos

patógenos, reduciendo el diámetro de las colonias de *B. cinerea* y *R. solani* a menos de 25 mm. Solamente se encontraron diferencias significativas en el efecto inhibitorio de la cepa Ta37 y los mutantes cuando se enfrentaron con *B. cinerea* o *R. solani*, estableciéndose que, para ambos patógenos, el mayor nivel de control de su crecimiento era ejercido primero por Ta37, seguido de Ta Δ Tri4 y, por último, de Ta Δ Tri5 (Fig. 56).

4.2. Ensayos de antagonismo en membrana.

En base a los resultados de los ensayos duales de enfrentamiento, se seleccionaron los patógenos *B. cinerea* y *R. solani* para llevar a cabo experimentos en mayor profundidad acerca de la capacidad de antagonismo ejercida por Ta37. Las diferentes cepas de *Trichoderma* mostraron diferente actividad antagonista frente a estos patógenos, diferencia que podría ser correlacionada con los diferentes niveles de HA producidos por cada una de ellas, aunque también podría ser debida a otro tipo de factores. El primer objetivo que se planteó fue determinar si la diferente capacidad por parte de los mutantes de controlar el crecimiento de los patógenos era debido a la variación en la producción de enzimas hidrolíticas de gran tamaño o de compuestos de pequeño peso molecular, como el HA. Para ello se realizaron experimentos de inhibición de crecimiento de colonias de cepas patógenas sobre 2 tipos de membranas diferentes: membranas de celofán, que permiten el paso de todo tipo de metabolitos y de enzimas extracelulares al medio de cultivo, y membranas de diálisis, que solamente permiten el paso de compuestos menores de 10 KDa.

El fundamento de este tipo de experimentos consistió en establecer el efecto de los compuestos extracelulares secretados al medio por parte de las cepas de *Trichoderma* sobre *B. cinerea* o *R. solani*, sin que medie contacto físico entre ambos hongos. Para ello se prepararon placas de PDA o MEA (según se tratase de *Rhizoctonia* o de *Botrytis*, respectivamente) sobre las que se colocó una membrana estéril (de celofán o de diálisis). En el centro de estas placas se colocó un taco de agar de la cepa de *Trichoderma* a estudiar y se incubó a 28°C durante 48 h, teniendo especial cuidado de que el micelio no creciera por fuera de la membrana y contaminase el medio. Transcurrido ese tiempo, se retiraron tanto la colonia de *Trichoderma* como la membrana y se puso un taco de agar con el patógeno en el mismo lugar en el que había estado el de *Trichoderma*, y se monitorizó su crecimiento cada 24 h. Como control del crecimiento del patógeno se prepararon placas en las que no se creció previamente *Trichoderma* y, como control de inhibición del crecimiento, se hicieron placas con la cepa T34, conocida por su capacidad de antagonismo frente a *B. cinerea* y *R. solani*.

Las tablas 14 y 15 recogen los valores del porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *R. solani* y *B. cinerea*, respectivamente, por parte de las cepas Ta37, T34, TaS4-9, TaΔTri4 y TaΔTri5. Se observó que los datos de inhibición del crecimiento sobre membranas de celofán fueron siempre similares o superiores a los obtenidos sobre membrana de diálisis. Estos valores fueron siempre mayores al emplear las cepas Ta37 y T34 que al aplicar cualquiera de las cepas mutantes en los 2 tipos de experimentos, siendo el porcentaje de inhibición mayor en el caso de la cepa TaS4-9, seguida de TaΔTri4 y, en último lugar, la cepa que peor controlaba el crecimiento de los patógenos era la TaΔTri5. Con respecto a las 2 cepas control utilizadas, se obtuvieron mejores resultados con la cepa Ta37, indicando que su efecto antagonista tanto sobre *R. solani* como sobre *B. cinerea* era mayor que el observado al emplear la cepa *T. harzianum* T34, una cepa con demostrada capacidad de biocontrol (Morán-Díez *et al.*, 2009).

		Ta37	T34	TaS4-9	TaΔTri4	TaΔTri5
24 h	Celofán	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00
	Diálisis	100 ^a ± 0,00	75,85 ^b ± 2,21	100 ^a ± 0,00	61,19 ^c ± 11,54	59,73 ^c ± 11,24
48 h	Celofán	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00
	Diálisis	100 ^a ± 0,00	78,76 ^b ± 1,33	100 ^a ± 0,00	70,59 ^c ± 8,45	63,08 ^c ± 7,69
72 h	Celofán	100 ^a ± 0,00	99,65 ^a ± 0,35	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00
	Diálisis	100 ^a ± 0,00	78,32 ^b ± 2,05	100 ^a ± 0,00	72,33 ^{b,c} ± 9,64	67,37 ^c ± 2,73
96 h	Celofán	100 ^a ± 0,00	96,00 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	96,59 ^a ± 2,22	95,18 ^a ± 2,14
	Diálisis	100 ^a ± 0,00	78,45 ^b ± 0,93	100 ^a ± 0,00	75,12 ^{b,c} ± 8,18	67,73 ^c ± 5,14
120 h	Celofán	100 ^a ± 0,00	94,98 ^b ± 0,00	100 ^a ± 0,00	94,97 ^b ± 3,59	88,05 ^b ± 6,41
	Diálisis	100 ^a ± 0,00	77,99 ^b ± 1,26	100 ^a ± 0,00	77,57 ^b ± 7,21	71,70 ^b ± 8,80

Tabla 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *R. solani* por parte de las diferentes cepas de *Trichoderma*. Cada experimento se hizo por triplicado. Letras diferentes en los superíndices muestran diferencias significativas entre las distintas cepas (ANOVA, $p < 0,001$) (estas diferencias también se muestran sombreadas para facilitar la lectura de la tabla).

		Ta37	T34	TaS4-9	TaΔTri4	TaΔTri5
24 h	Celofán	100 ^a ± 0,00				
	Diálisis	100 ^a ± 0,00				
48 h	Celofán	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	96,97 ^a ± 4,28	83,85 ^b ± 4,12
	Diálisis	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	95,71 ^a ± 4,28	86,23 ^b ± 0,36	77,01 ^c ± 2,93
72 h	Celofán	100 ^a ± 0,00	100 ^a ± 0,00	96,04 ^a ± 1,61	89,22 ^b ± 1,83	73,46 ^c ± 1,01
	Diálisis	88,79 ^a ± 0,26	87,14 ^a ± 1,07	82,92 ^a ± 2,70	66,29 ^b ± 5,92	46,44 ^c ± 1,24
96 h	Celofán	96,52 ^a ± 1,87	99,06 ^a ± 0,03	93,40 ^b ± 1,02	84,09 ^c ± 4,61	76,26 ^d ± 1,35
	Diálisis	92,68 ^a ± 0,17	86,90 ^b ± 0,48	87,70 ^b ± 0,30	48,25 ^c ± 2,63	39,02 ^c ± 0,70
120 h	Celofán	91,25 ^b ± 0,53	94,81 ^a ± 0,15	87,54 ^c ± 1,51	83,30 ^d ± 1,63	79,67 ^d ± 1,81
	Diálisis	93,76 ^a ± 0,61	78,06 ^b ± 0,64	89,03 ^a ± 1,29	38,28 ^c ± 4,39	28,82 ^c ± 1,22

Tabla 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *B. cinerea* por parte de las diferentes cepas de *Trichoderma*. Cada experimento se hizo por triplicado. Letras diferentes en los superíndices muestran diferencias significativas entre las distintas cepas (ANOVA, $p < 0,001$) (estas diferencias también se muestran sombreadas para facilitar la lectura de la tabla).

La figura 57 muestra un ejemplo de este tipo de experimentos, concretamente la acción de las diferentes cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *R. solani* utilizando membranas de celofán.

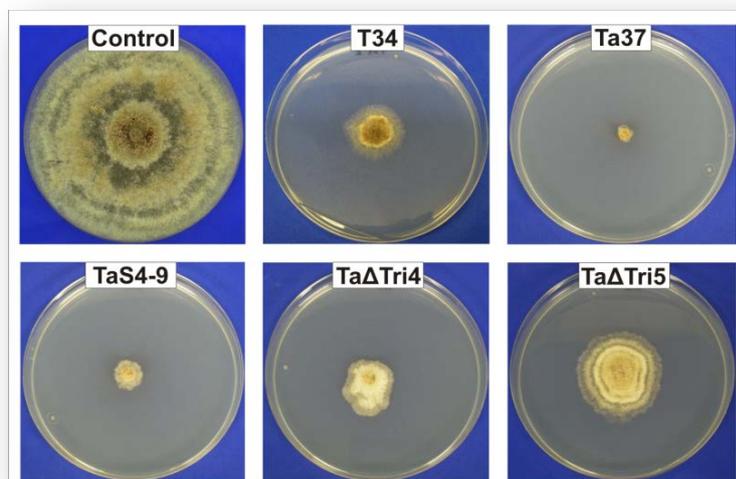


Figura 57. Ensayo de antagonismo en membrana de celofán. Inhibición del crecimiento de *R. solani* tras 6 días de incubación a 28°C de placas en las que previamente crecieron durante 2 días las cepas de *Trichoderma* indicadas sobre cada una de ellas.

4.3. Ensayos de inhibición de la germinación de esporas de *B. cinerea*.

El efecto de los metabolitos producidos por *Trichoderma* sobre el crecimiento de *B. cinerea* podría deberse a la acción que éstos ejercen sobre las esporas del patógeno. Para determinar si estos compuestos inhibían la germinación de las esporas de *B. cinerea* se planificaron ensayos en placas microtítulo de 96 pocillos, en los que se mezclaron diferentes cantidades de sobrenadantes de las cepas Ta37, Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5, esterilizados por filtración, con 300 esporas del patógeno. Tras 24 h de incubación a 22°C, en oscuridad y bajo condiciones de alta humedad, se determinó visualmente el grado de germinación de las esporas empleando un microscopio óptico invertido (Fig. 58).

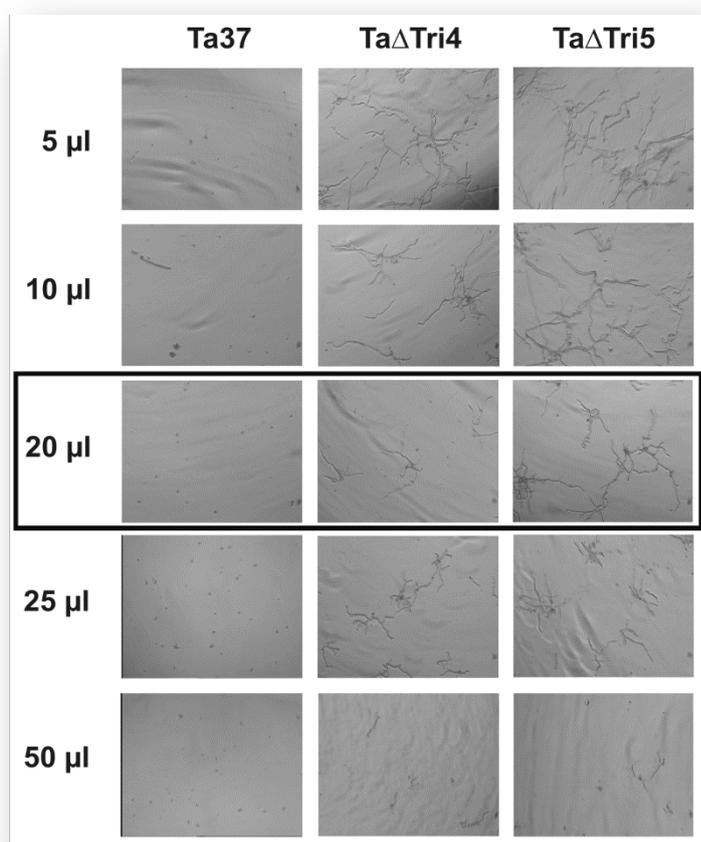


Figura 58. Inhibición de la germinación de las esporas de *B. cinerea* por parte de metabolitos producidos por las diferentes cepas de *Trichoderma*. Imágenes tomadas con un microscopio óptico invertido (4X). Se indica la cantidad de sobrenadante aplicado en cada pocillo. Se señala la condición en la que se aplicaron 20 μ l de sobrenadante ya que en ella ya se aprecia una importante inhibición en la germinación de las esporas del patógeno.

Como se pudo observar de manera cualitativa, incluso una cantidad mínima de sobrenadante de la cepa Ta37 fue capaz de inhibir de manera muy eficiente la germinación de las esporas de *B. cinerea*, mientras que, aunque también ejercían un control notable sobre dicha germinación, el efecto de los caldos de las cepas Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 fue mucho menor, siendo esta última cepa la que menos afectó a la germinación de las esporas del patógeno.

4.4. Ensayos de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por parte del HA.

Los estudios realizados hasta el momento indicaban que, aunque no de forma exclusiva, uno o varios metabolitos de bajo peso molecular, presente/s en la cepa Ta37, producido/s en menor cantidad progresivamente en las cepas Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5, participaba/n de manera notoria en la capacidad antagónica de Ta37 frente a los patógenos *R. solani* y *B. cinerea*. Para determinar si el HA era el responsable de esta actividad antifúngica, se llevaron a cabo bioensayos frente a *B. cinerea* empleando diferentes concentraciones de HA (Fig. 59.A) en los que se observó, efectivamente, que el HA era capaz de inhibir el crecimiento del patógeno y que la relación entre la concentración de HA y el halo de inhibición de *B. cinerea* era proporcional (Fig. 59.B), siendo 0,3 mg/ml una concentración suficiente de HA para inhibir de forma eficaz el crecimiento del patógeno.

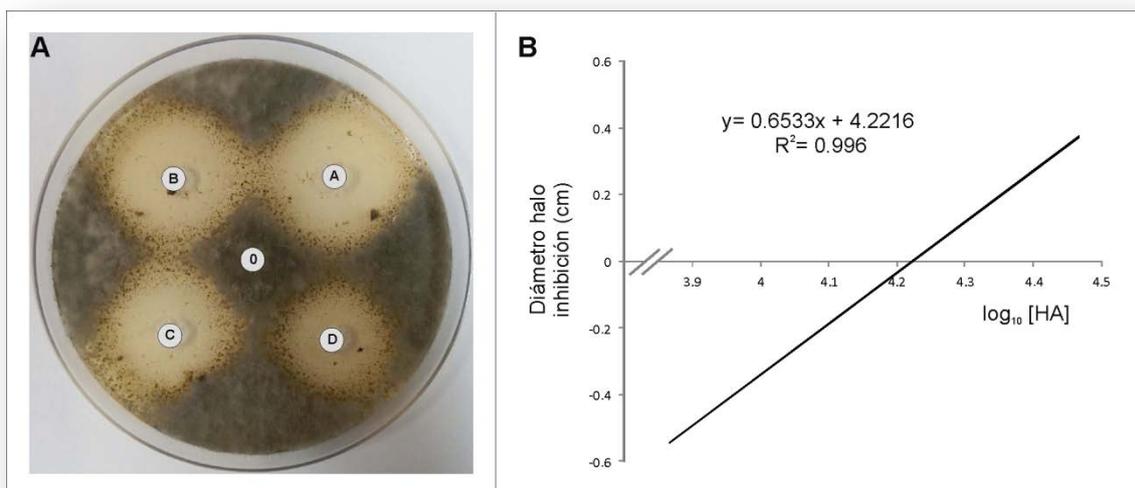


Figura 59. Bioensayo de HA frente a *B. cinerea*. A) Placa de bioensayo en la que se observan los halos de inhibición obtenidos con 2,4 (A), 1,2 (B), 0,6 (C) y 0,3 mg/ml de HA disuelto en acetonitrilo. En el pocillo marcado con 0 se aplicó acetonitrilo para comprobar si este solvente inhibía el crecimiento de *B. cinerea*. B) Recta patrón del diámetro de la zona de inhibición frente al \log_{10} de la concentración de HA.

4.5. Estudio de la actividad quitinasa.

Como ha quedado demostrado en apartados anteriores, los mutantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 son capaces de controlar el crecimiento de varios hongos fitopatógenos, aunque en menor medida que la cepa silvestre, indicando que otros factores independientes del HA

participan en su actividad antagónica. En el género *Trichoderma* uno de los principales factores que intervienen en esta actividad micoparasítica, junto con la antibiosis, es la producción de enzimas hidrolíticas (proteasas, quitinasas o glucanasas) que degradan la pared celular de los hongos diana. Por ello, se estudió la actividad quitinasa extracelular en cultivos de las diferentes cepas de *Trichoderma*, determinada por la reacción de hidrólisis del sustrato *p*-nitrofenil- β -D-glucosaminida para dar lugar al *p*-nitrofenol, compuesto cuya producción fue monitorizada a 410 nm en un espectrofotómetro. La actividad quitinasa extracelular medida en cultivos de 24 h no presentó diferencias entre las diferentes cepas sin embargo, a las 48, 72 y 96 h, dicha actividad fue superior en las cepas mutantes TaS4-9 y Ta Δ Tri4 respecto de las cepas Ta-pUR5750 (cepa Ta37 transformada con el plásmido pUR5750 sin inserto, tomada en este caso como cepa control) y Ta Δ Tri5. (Tabla 16).

	Actividad quitinasa específica (nmol / min / mg PS)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Ta-pUR5750	0,05 ^a ± 0,00	0,84 ^b ± 0,07	2,17 ^a ± 0,06	4,65 ^a ± 0,96
TaS4-9	0,41 ^a ± 0,25	3,66 ^c ± 0,11	6,97 ^c ± 0,25	11,61 ^b ± 1,41
Ta Δ Tri4	0,20 ^a ± 0,13	3,29 ^c ± 0,23	4,89 ^b ± 0,13	11,90 ^b ± 0,57
Ta Δ Tri5	0,06 ^a ± 0,00	0,18 ^a ± 0,03	1,79 ^a ± 0,14	4,24 ^a ± 0,07

Tabla 16. Actividad quitinasa específica medida en sobrenadantes de las cepas de *Trichoderma*. Los datos se expresan como nanomoles de *p*-nitrofenol formado por minuto y miligramo de peso seco (nmol/min/mg PS), medidos en 3 muestras independientes (n=3). Para cada tiempo de cultivo, las letras diferentes de los superíndices indican diferencias estadísticamente significativas según el test U-Mann-Whitney ($p < 0,05$).

4.6. Estudio de la expresión de los genes *tri* en la zona de interacción *Trichoderma* vs. patógeno.

El siguiente punto que se quiso esclarecer fue si el HA era producido de manera constitutiva por Ta37 o si, por el contrario, su producción variaba en el momento de enfrentarse a un hongo diana, participando activamente en la capacidad micoparasítica de la cepa Ta37. Para ello se estudió mediante qPCR el nivel de expresión de los genes *tri* en el micelio que se encontraba en contacto directo con los patógenos *R. solani* y *B. cinerea* B05-10, obtenido a partir de ensayos duales de enfrentamiento entre dichos hongos.

Comparando el nivel de expresión de los genes *tri* de micelio de la Ta37 en contacto con *R. solani* frente a la Ta37 creciendo aislada se determinó que la expresión de todos los genes *tri* (excepto del *tri10* que no experimentaba variación) se vio inducida (Fig. 60.A.1). Sin embargo, frente a *B. cinerea* B05-10, los genes *tri3*, *tri4* y *tri5* se expresaron a mayor nivel en la zona de interacción, mientras que el nivel de expresión de los genes reguladores *tri6*, *tri10* y del gen *tri11* no sufrió cambios (Fig.60.A.2), siendo el aumento en el nivel de expresión mayor cuando la cepa Ta37 se enfrentó al patógeno *R. solani* que cuando lo hizo frente a *B. cinerea*.

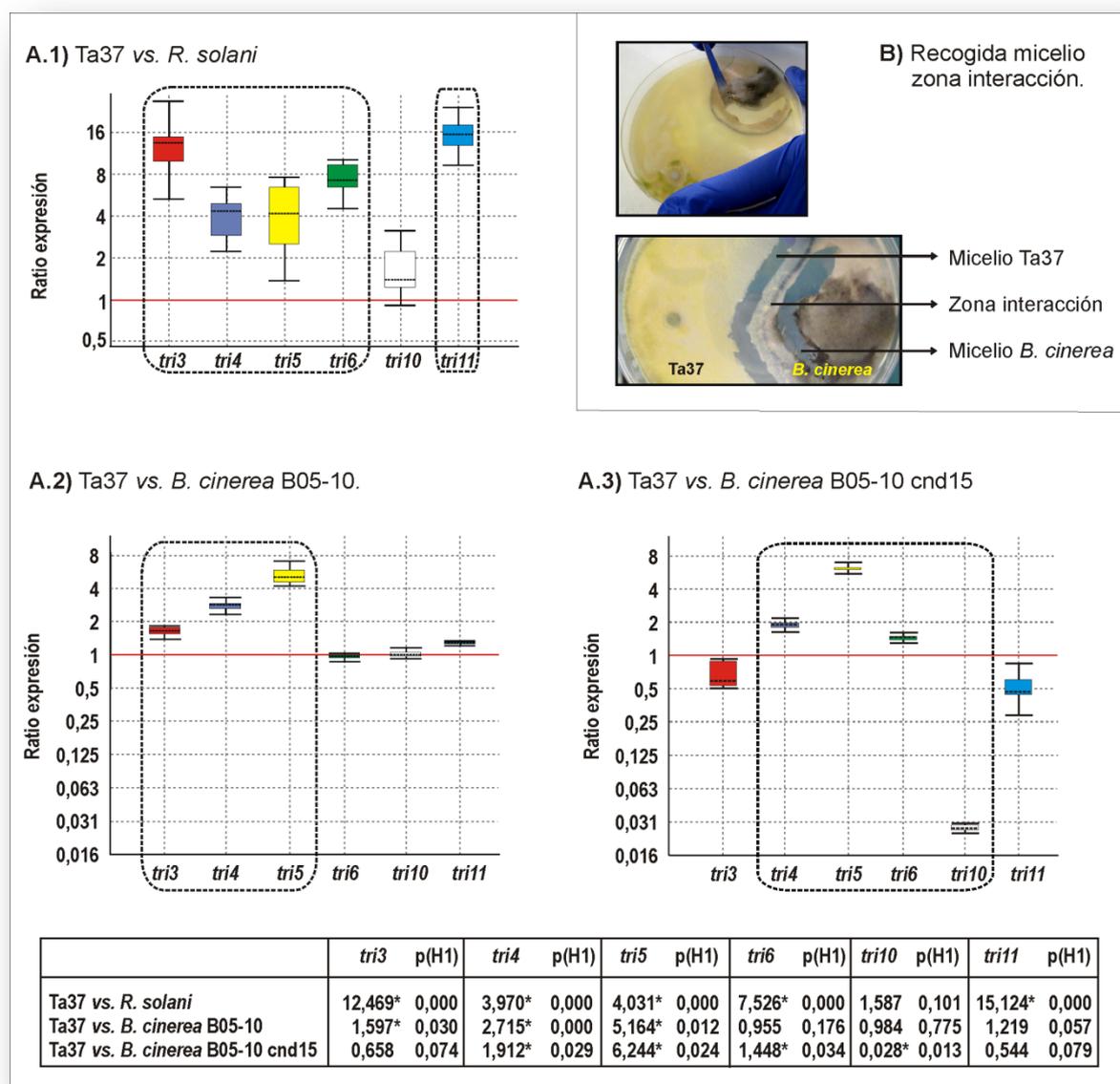


Figura 60. Estudio de la expresión de los genes *tri* de Ta37 en la zona de enfrentamiento con otros hongos. A) Expresión relativa de los genes *tri* en Ta37 en enfrentamiento con *R. solani* (1), *B. cinerea* B05-10 (2) y *B. cinerea* B05-10 cnd15 (3). Datos obtenidos mediante el programa REST2009. Los recuadros punteados indican niveles de expresión estadísticamente significativos frente a la condición control (Ta37 creciendo aislada) (n=3; p<0,05). B) Recogida del micelio de la zona de interacción.

Curiosamente, en el enfrentamiento de la cepa Ta37 con un mutante de *B. cinerea* B05-10 no productor de botridial [cepa B05-10 *cnd15* interrumpida en el gen *bot2* (Quidde *et al.*, 1999)], el patrón de expresión de los genes *tri* fue diferente al observado frente al *B. cinerea* productor de botridial (Fig. 60.A.3). Los genes *tri4* y *tri5* se vieron inducidos y el nivel de expresión del gen *tri11* no varió (al igual que frente a *B. cinerea* B05-10), sin embargo, la expresión del gen *tri3* no experimentó cambios y el gen *tri6* se vio inducido, pero lo más significativo fue la fuerte represión del gen *tri10*. Esta diferencia podría indicar un efecto directo de la fitotoxina botridial sobre la expresión de los genes *tri*, quizá actuando sobre los genes reguladores de la ruta de biosíntesis del HA ya que la expresión de dichos genes fue la que presentó una mayor variación.

4.7. Estudio de la expresión de genes de virulencia de *B. cinerea* B05-10.

La presencia de *B. cinerea* provocó la sobreexpresión de la mayoría de los genes *tri* estructurales (*tri3*, *tri4* y *tri5*) en Ta37, poniendo de manifiesto la influencia del patógeno sobre la cepa de *Trichoderma*. Para determinar si esta relación era bidireccional, es decir, si Ta37 también influía sobre el patógeno y, en caso afirmativo, si esta influencia podía ser empleada en el control de enfermedades causadas por *B. cinerea* en plantas, se llevó a cabo un estudio del nivel de expresión de diversos genes del patógeno considerados como factores de virulencia. Entre estos genes se encontraban varios genes *bot*, agrupados en el *cluster* de biosíntesis de la toxina botridial (Pinedo *et al.*, 2008), y los genes *sod1*, *atrB*, *bmp1* y *pg1* que codifican para la superóxido dismutasa (Rolke *et al.*, 2004), un transportador ABC (Schoonbeek *et al.*, 2001), una MAPK (Zheng *et al.*, 2000) y la endopoligalacturonasa 1 (Ten Have *et al.*, 1998), respectivamente. Mediante análisis de qPCR se determinó el nivel de expresión de los mencionados genes en *B. cinerea* en presencia de la cepa Ta37 frente a la expresión de los genes en el patógeno creciendo aislado (Fig. 61). También se estudió la influencia del mutante Ta Δ Tri5 sobre la expresión de los genes de virulencia con el fin de determinar si el HA (no producido por esta cepa) tenía algún efecto, de modo análogo a lo que ocurre con el botridial y la expresión de los genes *tri* de Ta37.

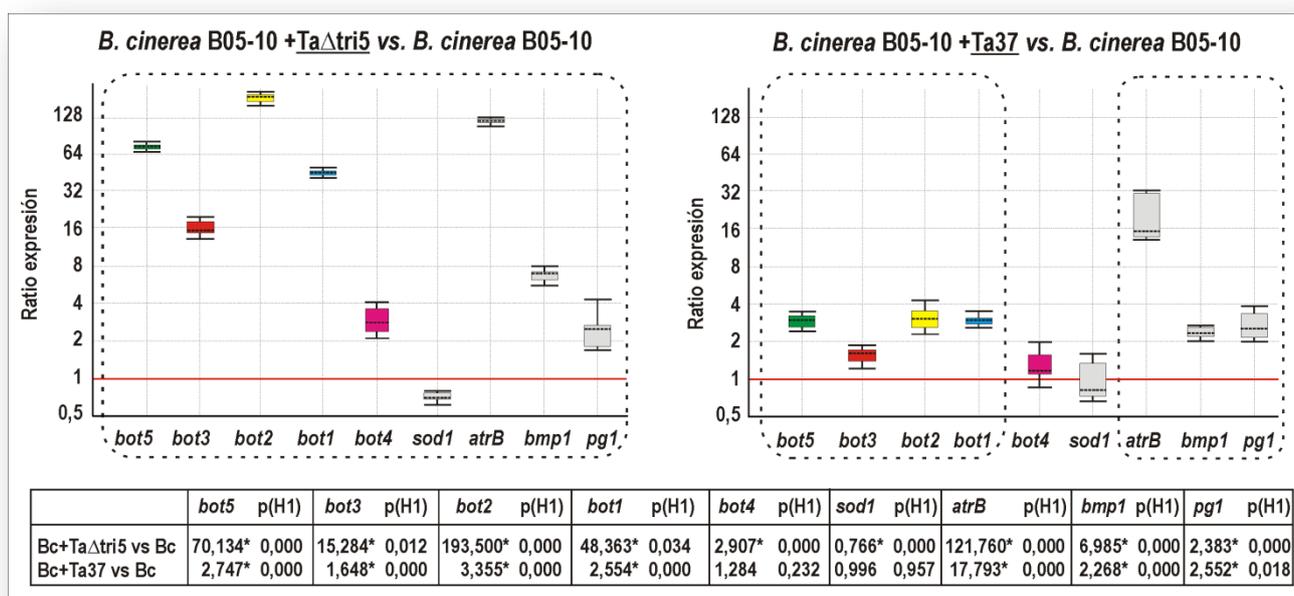


Figura 61. Análisis mediante qPCR de la expresión de varios genes de virulencia de *B. cinerea* B05-10 en enfrentamiento con las cepas Ta Δ Tri5 y Ta37. Las comparaciones y el estudio estadístico fueron llevados a cabo con el programa REST2009. El valor de la expresión relativa de cada uno de los genes con respecto al gen de referencia *EF1b* se indica en el panel inferior, cuyos datos señalados con un asterisco presentan diferencias estadísticamente significativas ($n=3$; $p<0,05$), y se corresponden con los rectángulos punteados en la representación gráfica.

La expresión de los genes *bot* estudiados se vio ligeramente inducida por la presencia de Ta37 en comparación con *B. cinerea* creciendo aislado. Esto indicaría que la presencia de un hongo antagonista como Ta37, es decir, un hongo dañino para el patógeno *B. cinerea* B05-10, provocaría un aumento en la producción de botridial a través de la inducción de sus genes de biosíntesis. Además, al enfrentarse *B. cinerea* B05-10 al mutante no productor de HA, la cepa Ta Δ Tri5, los genes *bot* se vieron inducidos a un nivel muy superior al mostrado frente a la cepa silvestre Ta37, por lo que el papel del HA en esta interacción podría consistir en la reducción de los niveles de botridial que *B. cinerea* B05-10 produciría frente a dicho hongo competidor.

Con respecto al resto de genes de virulencia, el gen *atrB* se vio drásticamente inducido por la presencia de ambas cepas, siendo esta inducción mucho más fuerte en presencia del mutante Ta Δ Tri5. Aunque a menor escala, lo mismo sucedió con el gen *bmp1*. El gen *pg1* también fue inducido por ambas cepas, sin que existieran diferencias significativas entre una cepa y otra. La expresión del gen *sod1* no se vio afectada ni por la presencia de Ta37 e incluso se vio ligeramente reprimido por la presencia del mutante Ta Δ Tri5.

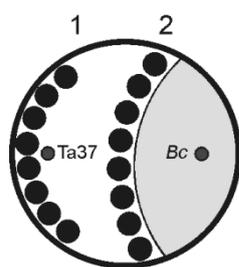
En conjunto, todos los genes de virulencia estudiados (excepto el *sod1*) se vieron inducidos en presencia de la cepa Ta37, quizá como un mecanismo de defensa de *B. cinerea* frente a un hongo competidor. Sin embargo, esta inducción fue mucho mayor en ausencia del HA, lo cual indicaría el papel represor de este trichoteceno sobre los genes de virulencia del patógeno.

4.8. Producción de HA en la zona de interacción.

Como se ha descrito anteriormente, en la zona de interacción entre Ta37 y *B. cinerea* B05-10 se establece una relación entre ambos hongos en la que cada uno modula la transcripción de determinados genes del otro, como por ejemplo la de los genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios como el HA en Ta37 o el botridial en *B. cinerea*.

Con el fin de determinar si la inducción de la mayoría de los genes *tri* estructurales en presencia del patógeno conllevaba efectivamente una mayor producción de HA en la zona de contacto entre ambos hongos, se tomaron 8 discos de agar de 1 cm de diámetro de la zona de interacción de ensayos duales de antagonismo, se extrajo el HA presente en ellos y se cuantificó mediante HPLC. También se tomaron discos de agar de la zona de crecimiento de Ta37 más alejada de *B. cinerea* y, como control, se tomaron discos de agar de placas en las que estaba creciendo la cepa Ta37 aislada. Además se analizó el HA presente en la zona de contacto entre Ta37 y la cepa *B. cinerea* B05-10 *cnd15* para dilucidar si las diferencias encontradas en el nivel de expresión de los genes *tri* con respecto al enfrentamiento con *B. cinerea* B05-10 se traducían en una mayor o menor producción de HA.

La cantidad de HA producido por la cepa Ta37 creciendo aislada fue de $7,118 \pm 0,619$ $\mu\text{g HA / ml}$ medio analizado. Como se puede observar en la tabla 17, la producción de HA se incrementó drásticamente en presencia de cualquiera de las 2 cepas de *B. cinerea* analizadas, indicando que en presencia del patógeno la síntesis de HA se vio inducida más de 4 veces. Si tenemos en cuenta la mayor o menor proximidad al patógeno, la producción del trichoteceno no se vio afectada frente a *B. cinerea* B05-10, sin embargo aumentó considerablemente cuanto más cerca se encontraba la cepa Ta37 del mutante *B. cinerea* B05-10 *cnd15* no productor de botridial. La no inducción de la síntesis de HA al aproximarse al patógeno *B. cinerea* B05-10 podría entenderse como que el botridial producido por esta cepa estuviera impidiendo la mayor síntesis de HA que sí se observa en las cercanías del mutante no productor de botridial.



	Producción HA ($\mu\text{g HA / ml medio}$)	
	<i>B. cinerea</i> B05-10	<i>B. cinerea</i> B05-10 cnd15
Zona más alejada (1)	31,063 ^a \pm 5,571	33,890 ^b \pm 3,460
Zona interacción (2)	36,477 ^a \pm 1,868	54,044 ^a \pm 8,911

Tabla 17. Producción de HA en la zona de interacción entre Ta37 y *B. cinerea* o *B. cinerea* B05-10 cnd15. Para cada cepa de *B. cinerea* empleada, las letras diferentes indican valores estadísticamente diferentes según la prueba U-Mann-Whitney ($n=3$; $p<0,05$). Nótese que la producción de HA por parte de la cepa Ta37 creciendo aislada fue de $7,118 \pm 0,619 \mu\text{g HA / ml medio}$ analizado.

DISCUSIÓN

El género *Trichoderma* comprende un grupo de especies muy interesantes debido a que producen una serie de enzimas hidrolíticas extracelulares y una gran variedad de metabolitos secundarios implicados en procesos de biocontrol, aunque también son capaces de producir compuestos fitotóxicos como los trichotecenos. *T. arundinaceum* es una especie escasamente estudiada, que no ha sido descrita como cepa de biocontrol, productora del trichoteceno HA cuya actividad antifúngica había sido demostrada previamente (Corley *et al.*, 1994). El capítulo 2 de esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de la especie *T. arundinaceum* como cepa antagónica de diversos hongos fitopatógenos, como *B. cinerea* y *R. solani*, y en determinar el papel del HA en la interacción con dichos hongos.

Para evaluar la participación del HA en la actividad micoparasítica ejercida por *Trichoderma* se hizo imprescindible la obtención de mutantes de Ta37 no productores de este trichoteceno. Inicialmente se optó por una estrategia de silenciamiento del gen *tri4* debido a que era el gen *tri* con mayor nivel de expresión y, por lo tanto, su alteración podría tener efectos muy importantes sobre la ruta de biosíntesis del HA. En el capítulo 1 de este trabajo se demostró que la proteína Tri4 codificaba para una P450 monooxigenasa multifuncional que controlaba la oxigenación del trichodieno en las posiciones C-2, C-12 y C-11 para dar lugar al isotrichodiol. Una vez obtenido el mutante TaS4-9 se observó que, aunque la producción de HA era menor, ésta seguía siendo demasiado elevada para nuestro propósito de obtener un mutante no productor por lo que se decidió generar una cepa interrumpida en el gen *tri4*, estrategia que había tenido éxito en *F. sporotrichioides* obteniéndose mutantes no productores de toxina T-2 que acumulaban trichodieno (Hohn *et al.*, 1995). Sin embargo, en vez de acumular trichodieno, la cepa interrumpida en el gen *tri4*, Ta Δ Tri4, acumulaba un compuesto que fue identificado como 12,13-epoxitrichoeno-2-ol. Este compuesto también aparecía en cultivos de la cepa Ta37 tratados con xantotoxina, un inhibidor de las P450 monooxigenasas, mientras que el mismo tratamiento en *Fusarium* provocaba el acumulo de trichodieno (Alexander *et al.*, 2008; Hesketh *et al.*, 1990). Estos resultados sugerían que el gen *tri4* podría ser parcialmente funcional en el mutante, pudiendo llevar a cabo las oxigenaciones en C-2 y C-12. No obstante, aunque la estrategia de interrupción permitía la transcripción del extremo 5' del gen, no daba lugar a un transcrito completo del gen *tri4* y, por lo tanto, no se sintetizaba una proteína Tri4 funcional, sugiriendo como hipótesis más plausible que las oxigenaciones del trichodieno eran llevadas a cabo

por 1 ó 2 P450 oxigenasas, diferentes de la Tri4, que convertirían eficientemente el trichodieno en 12,13-epoxitrichoeno-2-ol. La participación de otras enzimas P450 ha sido descrita en el género *Fusarium*, hidroxilando en las posiciones C-11 o C-2 del trichodieno o derivados del mismo (McCormick *et al.*, 1989; Tokai *et al.*, 2005). Estudios de cultivos de TaΔTri4 mediante GC-MS no detectaron la presencia de trichodermol. Sin embargo, el análisis de estos cultivos mediante HPLC reveló la producción de trazas de HA. Este fenómeno ya había sido observado en mutantes de *Fusarium* bloqueados en algún punto de la ruta de biosíntesis de trichotecenos como, por ejemplo, un mutante de *F. sporotrichioides* bloqueado en el gen *tri3* que producía pequeñas cantidades de toxina T-2 (McCormick *et al.*, 1996). La síntesis de trazas de HA sugería la existencia de otra P450 oxigenasa que pudiera convertir el 12,13-epoxitrichoeno-2-ol en isotrichodiol, aunque de manera poco eficiente, compuesto que posteriormente sería transformado en HA por acción de las enzimas Tri11 y Tri3, funcionales en este mutante.

Aunque la cepa TaΔTri4 prácticamente no producía HA, no podía ser utilizado para el análisis del papel de dicho compuesto en la capacidad antagónica de Ta37, por lo que se optó por interrumpir el gen *tri5* de manera que la ruta de síntesis del HA quedase bloqueada desde el inicio, al ser este gen el primero de la ruta. El estudio de caldos de cultivo del mutante TaΔTri5 mediante GC-MS o HPLC no reveló la presencia ni de HA ni de 12,13-epoxitrichoeno-2-ol, confirmándose la obtención de una cepa de Ta37 no productora de HA. Además, la introducción de una copia funcional del gen *tri5* en este mutante restauró la síntesis de HA, confirmando que el bloqueo de la ruta se debía, efectivamente, a la interrupción de dicho gen.

Todos los genes *tri* de Ta37 incluyen en su región promotora hipotéticos sitios de unión para el activador transcripcional de la ruta, la proteína Tri6, por lo que la expresión de estos genes debería estar coordinada. Sin embargo, los genes *tri* de Ta37 se expresaban a diferentes niveles, de forma similar a lo que ocurría con los genes de biosíntesis de esterigmatocistina/aflatoxina (ST/AF) en *Podospora anserina*, *Aspergillus flavus* y *A. nidulans* (Bennet y Klich, 2003; Price *et al.*, 2006). Estos genes estaban regulados por el regulador transcripcional AfIR y también tenían diferentes niveles de expresión (Rodríguez *et al.*, 2009).

El efecto general de la alteración del gen *tri4* en los mutantes TaS4-9 y TaΔTri4 sobre el resto de los genes *tri*, principalmente *tri4* y *tri5*, fue la disminución en su nivel de expresión probablemente debida a una deficiencia en el procesamiento del trichodieno y a la acumulación del 12,13-epoxitrichoeno-2-ol, que podría actuar como regulador negativo de la

ruta. Contrariamente, en el mutante Ta Δ Tri5 la expresión de todos los genes *tri*, a excepción del *tri4*, se vio incrementada quizás debido a la necesidad de la cepa de compensar la falta de HA o de eliminar el exceso de FPP que se estaría acumulando.

La expresión de otros genes implicados en pasos claves de la ruta de biosíntesis de terpenos se vio profundamente alterada en el mutante Ta Δ Tri5. Así, a las 24 h de crecimiento, el nivel de expresión de los genes *hmgR*, *dpp1* y *erg9* fue significativamente superior al de la cepa Ta37. Paralelamente, la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa aumentó considerablemente en el mutante Ta Δ Tri5, al igual que la producción de escualeno y ergosterol, la cual se vio incrementada en un 85% y un 88%, respectivamente. Estas alteraciones pueden ser entendidas como una respuesta de la célula para prevenir la acumulación tóxica de isoprenos pirofosfato, como es el caso del FPP, dirigiéndolo hacia la producción de otros compuestos como el escualeno/ergosterol o el farnesol. La expresión de los genes *erg1* y *erg7* no se vio afectada a las 24 h de cultivo, incluso cuando el nivel de producción de ergosterol fue mucho mayor que en la cepa silvestre, lo cual podría indicar que el nivel de expresión de estos 2 genes no constituye un cuello de botella en la biosíntesis de ergosterol. Se ha descrito en *S. cerevisiae* que la enzima escualeno epoxidasa (codificada por el gen *ERG1*) tendría un papel importante en la regulación del flujo de intermediarios a través de la ruta (Veen *et al.*, 2003), ya que se ha demostrado que tiene un mayor valor de K_m por su sustrato y una menor actividad específica que la escualeno sintasa (enzima que actúa inmediatamente antes en la ruta y que es codificada por el gen *ERG9*) lo cual podría llevar a una acumulación de escualeno si el flujo a través de la ruta de síntesis de ergosterol sobrepasaba cierto límite (Asadollahi *et al.*, 2010).

A las 96 h de cultivo, el nivel de escualeno en el mutante Ta Δ Tri5 fue similar al de la cepa silvestre, incluso cuando se seguía produciendo una acumulación de ergosterol, aunque dicha diferencia entre las 2 cepas empezaba a disminuir. Esto podría indicar que a las 96 h el escualeno acumulado estaba siendo eficientemente procesado hacia ergosterol. Los niveles de expresión de los genes *hmgR*, *dpp1* y *erg9*, así como la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, se vieron reducidos en comparación con la cepa Ta37, probablemente debido a la falta de acumulación de escualeno y/o FPP. La expresión de los genes *erg1* y *erg7* también se vio reprimida en el mutante, incluso cuando el nivel de ergosterol continuaba siendo superior que en la cepa silvestre, lo que nos permitió reafirmar la hipótesis de que la expresión de estos genes no es limitante para la síntesis de ergosterol a ninguno de los tiempos ensayados. Este resultado podría ser relacionado con un fenómeno descrito en *S. cerevisiae*, donde la represión del gen *ERG9* provocaba la

redirección del *pool* de FPP hacia la biosíntesis de sesquiterpenos (Asadollahi *et al.*, 2010; Paradise *et al.*, 2008).

El ergosterol tiene un papel estructural en la membrana celular de hongos por lo que su aumento en el mutante Ta Δ Tri5 podría explicar su mayor tasa de crecimiento en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, esta mayor tasa de crecimiento podría ser explicada como un efecto indirecto de la acumulación de FPP en este mutante, FPP que podría ser canalizado hacia la síntesis de farnesol, compuesto que aceleraría la degradación de la enzima HMG-CoA reductasa en mamíferos (Meigs y Simoni, 1997; Leichner *et al.*, 2011), dirigiendo el *pool* de acetil-CoA hacia la síntesis de ácidos grasos, provocando así un mayor crecimiento en la cepa Ta Δ Tri5. Esta hipótesis también se basa en la caracterización metabolómica de un mutante de *Fusarium* interrumpido en el gen *tri5*, en la que se observó que la síntesis de trichotecenos estaba directamente relacionada con el acetil-CoA y el HMG-CoA, compuestos pertenecientes a la ruta del mevalonato, generando a su vez, cambios en la ruta de los ácidos tricarbóxicos, dejando claro el importante papel de los trichotecenos en la fisiología y el desarrollo de los hongos que los producen (Chen *et al.*, 2011).

La regulación de la ruta del mevalonato en eucariotas es muy compleja y la actividad de la HMG-CoA reductasa o el punto de ramificación a partir del FPP representan 2 puntos clave en dicha regulación (Maury *et al.*, 2005). La enzima HMG-CoA reductasa ha sido estudiada principalmente en mamíferos donde se ha descrito recientemente que su degradación en el retículo endoplásmico (ERAD) está regulada por una señal no derivada de esteroides compuesta por una proteína unida a geranylgeranyl-PP, y por una señal derivada de esteroides compuesta por el escualeno (Leichner *et al.*, 2011) (Fig. 62). Todavía no se conoce si en el caso de los hongos filamentosos la degradación de la enzima HMG-CoA reductasa ocurre de un modo similar, sin embargo, el aumento en la actividad de dicha enzima y el nivel de ergosterol observado a las 24 y a las 96 h podrían ser explicados como un modo de evitar la acumulación de escualeno, lo cual indicaría la existencia de un mecanismo de regulación de la degradación de la HMG-CoA reductasa similar al descrito en mamíferos.

Por otro lado, a las 96 h la actividad HMG-CoA reductasa continuaba siendo superior en el mutante (+23,9%) incluso cuando el nivel de expresión del gen *hmgR* era menor que en la Ta37 (0,296; p=0,000). Esta falta de correlación entre el nivel de expresión del gen *hmgR* y la actividad de su correspondiente enzima podría ser debida no sólo a la degradación del enzima sino también a otros fenómenos como la estabilidad de los ARNm,

la saturación de los ribosomas o la acumulación y estabilidad de las proteínas (Maier *et al.*, 2009).

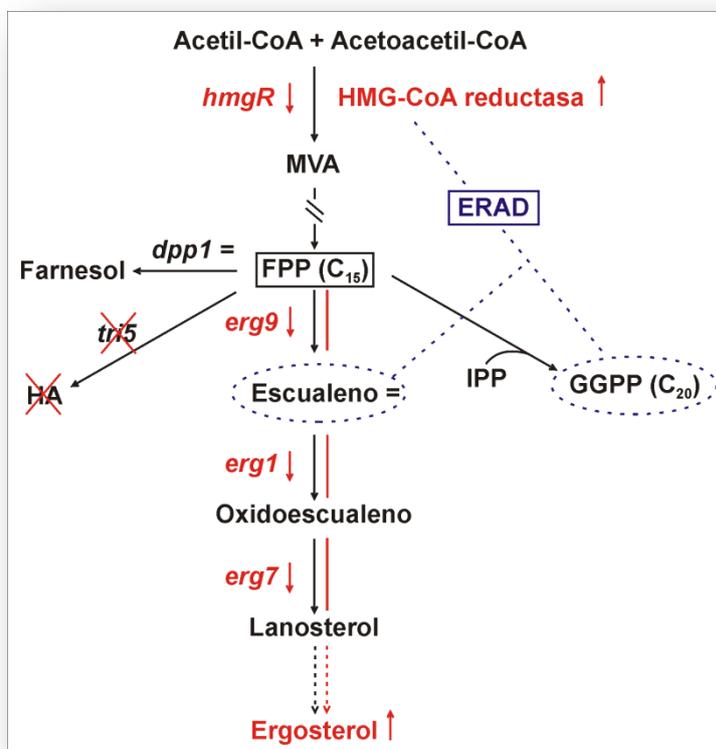


Figura 62. Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de terpenos. En rojo se indican los cambios observados en el mutante Ta Δ Tri5 en comparación con la cepa Ta37 en micelio crecido durante 96h. En morado se muestran las señales necesarias para la ERAD de la enzima HMG-CoA reductasa descritas en mamíferos (Leichner *et al.*, 2011).

La actividad quitinasa en los transformantes TaS4-9 y Ta Δ Tri4 se vio incrementada con respecto a la cepa Ta37, a pesar del diferente nivel de producción de HA en ambos mutantes, lo cual podría explicar porqué la cepa Ta Δ Tri4 seguía manteniendo un nivel de control significativo sobre hongos fitopatógenos. Así, aunque se haya demostrado que el HA está implicado en la actividad de biocontrol/micoparasítica de Ta37, la actividad quitinasa (y la de otras enzimas hidrolíticas) obviamente también contribuiría a esta actividad. La diferente capacidad de biocontrol de estos 2 mutantes podría ser debida a la diferente producción de HA ya que el nivel de actividad quitinasa es muy similar en ambos.

En el mutante Ta Δ Tri5, el nivel de actividad quitinasa observado era muy similar al de la cepa silvestre, lo cual contrastaba con el incremento de dicha actividad en los mutantes

del gen *tri4*. A pesar de que todos estos mutantes tenían alterada la misma ruta biosintética, había diferencias muy notables entre ellos, como por ejemplo la producción del compuesto 12,13-epoxitrichoeno-2-ol y derivados en el mutante Ta Δ Tri4 que podrían tener algún efecto inductor en la expresión de genes que codifican para quitinasas. Estos compuestos, así como otros derivados de la ruta de síntesis de trichotecenos, no estaban siendo generados en el mutante Ta Δ Tri5 por lo que la actividad quitinasa no estaba siendo inducida. Aunque se ha demostrado que el trichoteceno DON reprime la expresión del gen *nag1*, que codifica para una N-acetil- β -D-glucosaminidasa, una de las enzimas degradadoras de pared celular producida por *T. atroviride* P1 (Lutz *et al.*, 2003), los efectos de otros trichotecenos sobre los genes de quitinasas son desconocidos. Si los intermediarios de la ruta de biosíntesis del HA en Ta37 tuvieran un efecto directo sobre sus propias quitinasas, esta cepa aparentemente podría inducir la expresión de sus propias quitinasas cuando el nivel de HA se viera reducido, quizá en un esfuerzo por mantener su nicho ecológico, mediante una respuesta similar a la ejercida por *T. atroviride* P1 en ensayos de antagonismo frente a cepas de *Fusarium* con una menor producción de DON (Lutz *et al.*, 2003).

La actividad antifúngica de las cepas Ta37, Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 sobre los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *R. solani* fue notablemente diferente y, en todos los casos, la inhibición del crecimiento radial del patógeno fue mayor al emplear membranas de celofán que cuando se utilizaban de diálisis. Por ejemplo, Ta37 inhibía el 100% del crecimiento de *B. cinerea* empleando membrana de celofán, mientras que al utilizar membrana de diálisis lo hacía en un 88%, indicando que alrededor del 12% de esta inhibición era debida a un compuesto de más de 10 kDa (límite de peso molecular que permitía a un compuesto y/o proteína atravesar la membrana de diálisis) (nótese que el HA tiene un peso molecular de 0,4 kDa y, por lo tanto, pasaría a través de este tipo de membrana). Por otro lado, el mutante Ta Δ Tri5 no productor de HA no tuvo un efecto importante sobre el control del crecimiento de *B. cinerea*, sugiriendo que el HA era el responsable de alrededor del 26% de la inhibición (medido en ensayos con membranas de celofán). Si el HA fuese el único responsable de la actividad antifúngica de Ta37, se esperaría un 0% de inhibición del crecimiento del patógeno empleando la cepa Ta Δ Tri5 en experimentos con membranas de celofán, sin embargo la inhibición observada fue de un 74%, sugiriendo que, en el caso de *B. cinerea*, el HA es el responsable de impedir el crecimiento en un 26% mientras que otros metabolitos y/o enzimas son responsables del 74%, del cual un 12% sería debido a compuestos mayores de 10 kDa. Estos cálculos sugerían que el mutante Ta Δ Tri5 en ensayos con membrana de diálisis debería exhibir una inhibición del 62%, sin embargo los datos indicaron que era del 46,4%. Puede que la mayor tasa de inhibición observada sobre

membrana de diálisis empleando la cepa silvestre se debiera a una interacción sinérgica entre el HA y otros metabolitos y/o enzimas, interacción que no existiría en el mutante no productor de HA resultando en una menor inhibición del crecimiento del patógeno no solamente debida a la carencia de HA. Esta interacción sinérgica también se vio apoyada por los datos obtenidos frente al patógeno *R. solani*.

La reducción en la capacidad de biocontrol del mutante interrumpido en el gen *tri5* frente al mutante interrumpido en el *tri4* podría ser explicada como una consecuencia de la falta de HA, o cualquier otro derivado de su ruta de biosíntesis, en el primer mutante, mientras que en la cepa Ta Δ Tri4 se producían diversos compuestos colaterales que, junto con el mayor nivel de actividad quitinasa, podrían contribuir al aumento de esta actividad de biocontrol en el mutante Ta Δ Tri4 frente al Ta Δ Tri5.

El enfrentamiento entre las cepas Ta37 y Ta Δ Tri5 frente a *B. cinerea* dio como resultado la inducción de los genes de biosíntesis de botridial en el patógeno, especialmente cuando el HA no estaba siendo producido. Esto provocaría, presumiblemente, un aumento en la producción de la toxina botridial por parte de *B. cinerea* en un intento por defenderse de Ta37. Sin embargo, el hecho de que la inducción de los genes *bot* sea mucho más notable en presencia del mutante Ta Δ Tri5 podría implicar una modulación de la expresión de los genes *bot* llevada a cabo por Ta37, a través del trichoteceno HA, como una vía para limitar la producción de la toxina por parte de *B. cinerea*. Entonces, la inducción de los genes de síntesis de botridial podría deberse directamente a la falta de HA, por lo que este compuesto ejercería un efecto represor sobre estos genes, o bien podría deberse a la producción o al incremento en la producción de otro compuesto (en ausencia de HA) que pudiera tener ese efecto inductor sobre los genes *bot* (Fig. 63). De modo similar, se sabe que el bloqueo en la síntesis de botridial en *B. cinerea* induce la síntesis de ácido boticínico, un poliquétido que tendría un papel redundante con el botridial en la virulencia del patógeno (Dalmais *et al.*, 2011).

Así, la represión de los genes *bot* por parte del HA podría consistir en un mecanismo específico que implicaría una interacción regulatoria entre metabolitos producidos por estas especies de hongos antagónicos. Hechos similares han sido descritos en interacciones en las que la presencia de ciertas cepa de *Trichoderma* que producían 6-pentil- α -pirona (6PAP), un compuesto implicado en la actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* T34 (Rubio *et al.*, 2008), inhibía la producción de DON por parte de *F. graminearum* entre un 66 y un 81% (Cooney *et al.*, 2001). De modo similar a lo observado en esta Tesis Doctoral, *Trichoderma* producía mayores niveles de 6PAP en respuesta a la presencia de un hongo competidor

(Cooney y Lauren, 1998), mientras que la producción de HA por la cepa Ta37 se vio multiplicada por 4 en ensayos de enfrentamiento con *B. cinerea* B05-10, coincidiendo con la inducción de los genes *tri* por parte de este patógeno. Otro dato que apoyaría la función represora del HA sobre los genes *bot* es que la producción de botridial, medida en ensayos de enfrentamiento, disminuye a medida que se aproxima la zona de interacción entre *B. cinerea* B05-10 y la cepa Ta37 y, además, la cantidad de botridial sintetizado es menor en presencia de la cepa silvestre que de los mutantes Ta Δ Tri4 o Ta Δ Tri5 (Tabla 18; Fig. 63) [Malmierca *et al.*, 2013 (artículo enviado a publicar); Dr. Collado, comunicación personal].

	Producción botridial (mg)		
	Ta37	Ta Δ Tri4	Ta Δ Tri5
Zona más alejada	0,78	0,81	0,76
Zona interacción	0,05	0,39	0,61

Tabla 18. Producción de botridial por parte de *B. cinerea* B05-10 en enfrentamiento con las cepas Ta37, Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5.

Además, la fuerte inducción del gen *bmp1* (que codifica para un transportador ABC) en presencia de las cepas de *T. arundinaceum* estudiadas en este trabajo podría ser un mecanismo de resistencia mediante el cual este transportador de membrana minimizaría el acceso de compuestos dañinos producidos por *Trichoderma* a sus dianas localizadas en el interior de las células de *B. cinerea*. Sin embargo, aunque este transportador ABC protegería al patógeno frente al HA producido por Ta37, su gen codificante no se vería inducido por el trichoteceno (ya que también se expresa a mayor nivel en presencia del mutante Ta Δ Tri5), sino que sería inducido por otro tipo de compuesto o señal generada por *Trichoderma*. Este resultado contrasta con lo descrito en *T. atroviride*, donde se ha observado la inducción del gen que codifica para un transportador ABC debida a la presencia de micotoxinas secretadas por patógenos o de algunos fungicidas (Ruocco *et al.*, 2009).

Figura 63. Representación esquemática de las relaciones que se establecen entre *B. cinerea* y las cepas Ta37 o Ta Δ Tri5. Se muestran las interacciones deducidas de los estudios de antagonismo entre Ta37 (A.1) y Ta Δ Tri5 (A.2) con el patógeno *B. cinerea* B05-10 y entre Ta37 con *B. cinerea* B05-10 (B.1) y el mutante *B. cinerea* B05-10 cnd15 (B.2). Las líneas rojas indican el efecto producido por *B. cinerea* sobre *Trichoderma* y las líneas verdes el efecto de *Trichoderma* sobre el patógeno. Las flechas indican sobreexpresión de genes (a mayor tamaño de las flechas, mayor expresión) o aumento o disminución de la producción de un metabolito, y las líneas con borde romo significan represión de genes o inhibición del crecimiento. (a) Efecto conjunto del BOT y otros metabolitos producidos por *B. cinerea* que participan en la interacción con *Trichoderma*. (b) Efecto conjunto del HA y de las enzimas hidrolíticas producidas por Ta37 que inhiben el crecimiento del patógeno. (c) Efecto de otros metabolitos producidos por Ta37 que también afectan a *B. cinerea*. (d) Acción de otros metabolitos producidos por *B. cinerea* B05-10 cnd15 sobre la expresión de los genes *tri* de Ta37. Los genes de *Botrytis* indicados en negrita verde muestran un incremento drástico en su expresión en interacción con Ta Δ Tri5 en comparación con Ta37 (A). Los genes de *Trichoderma* indicados en negrita roja muestran un incremento drástico en su expresión en interacción con *B. cinerea* B05-10 cnd15 en comparación con *B. cinerea* B05-10 (B).



Capítulo 3



Plantas de tomate de 4 semanas.

Efecto de las cepas de *Trichoderma* sobre la infección causada por *B. cinerea* en plantas de tomate.

Inducción de los genes de defensa en plantas de tomate por parte de las cepas de *Trichoderma*.

INTRODUCCIÓN

1. Efectos directos de *Trichoderma* sobre la planta.

Al principio del estudio de *Trichoderma* como ACB se creía que su efecto beneficioso sobre las plantas era debido a la acción antagonista que ejercía frente a otros microorganismos fitopatógenos (descrito en el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral). Sin embargo, cada vez se está dando más importancia al efecto directo que ejerce sobre la propia planta, mediante el proceso conocido como biofertilización y la inducción de respuestas defensivas de la planta frente al ataque de patógenos.

1.1. Biofertilización.

La colonización de la raíz por parte de *Trichoderma* frecuentemente aumenta el crecimiento y el desarrollo de la raíz, así como la productividad del cultivo, la resistencia a estreses abióticos y la utilización de nutrientes. Se ha visto que la productividad puede incrementarse hasta un 300% tras el tratamiento con *T. harzianum* T22 y *T. atroviride* P1 en lechuga, pimiento y tomate (Vinale *et al.*, 2008a).

Este efecto de biofertilización también puede darse sin que medie contacto físico entre el hongo y la planta: se ha detectado la producción de moléculas semejantes a citoquininas, como zeatina y giberelina GA3, por parte de algunas cepas de *Trichoderma*, que pueden actuar como factores de crecimiento en planta (Osiewacz, 2002).

Junto con estas acciones, *Trichoderma* también puede solubilizar micronutrientes presentes en el suelo, haciéndolos fácilmente asimilables por la planta, incluyendo hierro, fósforo y magnesio (Harman *et al.*, 2004).

1.2. Estimulación de las defensas sistémicas de las plantas.

El contacto con otros organismos hace que la planta reaccione activando una serie de mecanismos de defensa, siendo los principales la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) (Fig. 64).

La respuesta SAR se ve activada por la infección local por parte de un organismo patógeno, confiere una resistencia a largo plazo frente a posteriores ataques del patógeno, está relacionada con la inducción de genes PR y en ella participa el ácido salicílico (SA) como molécula señal.

La respuesta ISR se pone en funcionamiento tras el ataque de algunos patógenos o tiene lugar tras la colonización de la raíz por parte de organismos no patógenos. En ella participan las rutas señaladoras del ácido jasmónico (JA) seguida de la del etileno (ET).

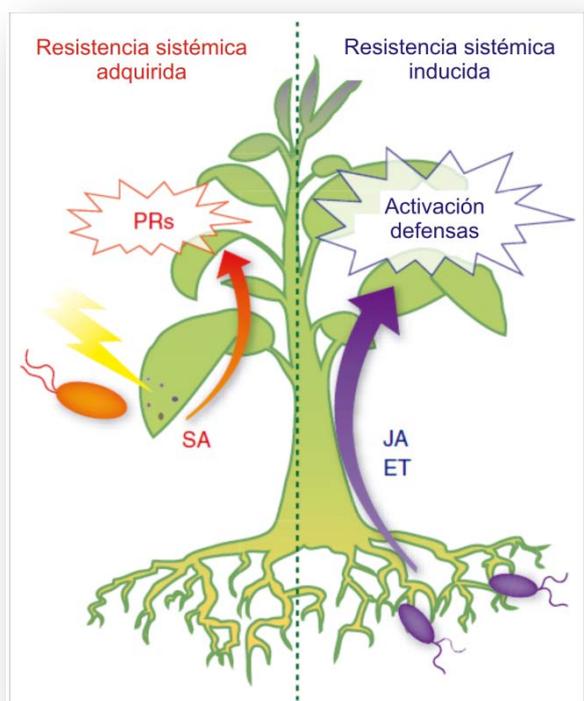


Figura 64. Representación esquemática de las respuestas defensivas sistémicas en planta. Organismos patógenos activan la respuesta sistémica adquirida mientras que organismos beneficiosos generan una respuesta sistémica inducida. Imagen tomada de Pieterse *et al.*, 2009.

Los mecanismos por los cuales se activan estas rutas están controlados por la interacción entre moléculas del hongo con receptores de la pared celular de las plantas, activando la cascada de señalización de las MAPK, que lleva en último término a la inducción de proteínas reguladoras, incluyendo proteínas de unión al ARN o a GTP, y de

factores de elongación o transcripción, entre otros (Shoresh y Harman, 2008a; Shoresh *et al.*, 2005). Toda esta cascada de respuestas conduce a un aumento en la producción de proteínas relacionadas con defensa (por ejemplo, glucanasas, enzimas implicadas en la síntesis de pared celular o en la síntesis de fitoalexinas) y estrés (enzimas de protección frente a estrés oxidativo) (Shoresh *et al.*, 2010).

Algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de colonizar raíces de plantas de forma duradera y penetrar en su epidermis, donde producen compuestos que inducen respuestas de resistencia, tanto locales como sistémicas, por parte de las plantas. Este tema se desarrollará más ampliamente a continuación.

2. Respuestas defensivas en plantas.

Las plantas se encuentran expuestas a un gran número de microorganismos, tanto beneficiosos como perjudiciales, por lo que han desarrollado complejos mecanismos de defensa cuyo objetivo no es otro que impedir la infección provocada por organismos patógenos y la evolución de las consiguientes enfermedades.

Los mecanismos de defensa en plantas pueden dividirse en 2 categorías (Dickinson, 2003):

- **Pasivos o constitutivos:** su misión es la de establecer barreras que protejan a la planta frente al ataque inicial de un patógeno. Incluyen elementos estructurales como la cutícula y compuestos antimicrobianos preformados. Estos compuestos preformados (generalmente saponinas y glucosinolatos) suelen encontrarse en vacuolas y orgánulos de células localizadas en las partes más superficiales de los tejidos.
- **Activos o inducibles:** su papel es impedir el asentamiento del patógeno y la diseminación de la enfermedad. Ejemplos de mecanismos activos de defensa son: la respuesta hipersensitiva (o muerte celular localizada) y la inducción de genes en el genoma de la planta implicados en el refuerzo de la pared celular, en la reparación de estructuras de defensa, en la síntesis de compuestos antimicrobianos (ej. fitoalexinas), de enzimas hidrolíticas y de otras proteínas relacionadas con defensa (proteínas PR).

2.1. Inducción de las respuestas de defensa.

Para que se induzcan los mecanismos de defensa de la planta, ésta debe “sentir” que está siendo atacada. Para ello, la planta detecta elementos comunes a los organismos patógenos tales como flagelina y lipopolisacáridos en bacterias y quitina y β -glucanos en hongos, Estos elementos característicos son conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PAMPs son reconocidos por receptores de la planta iniciando una cascada de eventos que termina con la activación de las defensas de la planta.

Las respuestas inducibles defensivas pueden ser de 2 tipos: locales o sistémicas. Las últimas consisten en la inducción de resistencia en partes de la planta alejadas de la zona de acción del patógeno a través de señales sistémicas (fitohormonas), y se dividen en 2 grupos: SAR e ISR. Dependiendo del tipo del patógeno que esté atacando a la planta, esta reacciona sintetizando una o más fitohormonas que inician la cascada de señalización que culmina en la activación de las defensas sistémicas.

Nos centraremos en la descripción de las respuestas defensivas sistémicas (SAR e ISR) ya que su inducción por parte de *Trichoderma* es el tema en el que se basa el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral.

2.1.1. Resistencia sistémica adquirida (SAR).

Una vez inducida, su efecto es duradero y se ve reforzado por infecciones sucesivas, siendo eficaz frente a patógenos diferentes de los que estimularon la respuesta inicial, confiriendo así un amplio rango de protección.

En el caso de la SAR, la respuesta se activa frente al ataque de patógenos, es especialmente efectiva frente a patógenos biotrofos y la fitohormona implicada es el ácido salicílico (SA) (Pieterse *et al.*, 2009).

La infección inicial por parte del patógeno (hongos, bacterias o virus) hace que se produzcan ROS (tóxicas para los patógenos) y óxido nítrico en la zona del ataque, provocando una respuesta hipersensitiva (HR) en la planta, cuya consecuencia es la muerte celular programada o necrosis de la zona. Todas estas señales hacen que se fortifiquen las paredes celulares mediante deposiciones de callosa y lignina (impidiendo la diseminación

del patógeno) y se incrementa la síntesis de SA, compuesto que se desplaza a través del floema hacia partes alejadas de la planta y que inicia la cascada señalizadora hacia la activación de los genes de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 2000). Brevemente, el SA provoca un cambio en el potencial redox de las células resultando en la activación del factor transcripcional NPR1 que se encuentra en el citosol. El NPR1 activo entra en el núcleo celular interaccionando con diversos factores de transcripción que activan la expresión de genes de respuesta a SA, tales como genes PR que codifican para proteínas relacionadas con defensa. Se conocen varios tipos de proteínas PR, cuya función es muy variable: quitinasas que degradan la pared celular de los patógenos, glucanasas, proteasas, ARNasas, peroxidasas, etc.

2.1.2. Resistencia sistémica inducida (ISR).

La acción de patógenos y de las heridas provocadas por insectos o nematodos herbívoros desencadenan la respuesta tipo ISR, siendo muy efectiva frente a patógenos necrotrofos. En este caso, las moléculas señalizadoras son el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Pieterse *et al.*, 2009).

En la ruta de señalización del JA, la E3 ubiquitina ligasa SCF^{col1} está unida a proteínas JAZ (*JA ZIM-domain*) formando un complejo que reprime la transcripción de los genes de respuesta a JA. Tras la acumulación de JA en respuesta a la presencia de un patógeno, las proteínas JAZ son degradadas dando lugar a la activación de los genes de respuesta a JA por la acción de factores de transcripción como MYC2, ERF1 y ORA59.

En la cascada de señalización mediada por ET, receptores de membrana como ETR1 mantienen una regulación negativa sobre la proteína CTR1, que a su vez reprime al regulador positivo EIN2. Tras la percepción del ET, la represión ejercida por CTR1 desaparece y la ruta señalizadora continúa a través de EIN2. Gracias a la acción de factores de transcripción como EIN3 se activan otros reguladores positivos como ERF1 (lo que enlaza con la ruta del JA), expresándose de este modo los genes de respuesta a ET.

La respuesta tipo ISR es independiente de proteínas PR y entre sus efectos se encuentran la síntesis de defensinas (compuestos con actividad antimicrobiana), quitinasas e inhibidores de proteasas del patógeno. Entre los genes inducidos en tomate mediante esta ruta se incluyen el gen PINI, el gen PINII (ambos codifican para inhibidores de proteasas) y el gen TomLoxA (codifica para una lipooxigenasa).

Ambas rutas (SAR e ISR) se hallan interconectadas. Por ejemplo, se sabe que la función citoplasmática del NPR1 controla las respuestas dependientes de JA/ET, mientras que la función nuclear del NPR1 es la de regular las respuestas dependientes de SA. Por ello se dice que el SA es un supresor de la ruta del JA.

Por lo tanto, el ataque de un patógeno origina una serie de respuestas por parte de la planta que comienzan en la zona del ataque (respuestas locales) y que, mediante la activación de diversas cascadas señalizadoras por parte de las fitohormonas SA o JA/ET, se extienden posteriormente al resto de la planta (respuestas sistémicas) (Fig. 65).

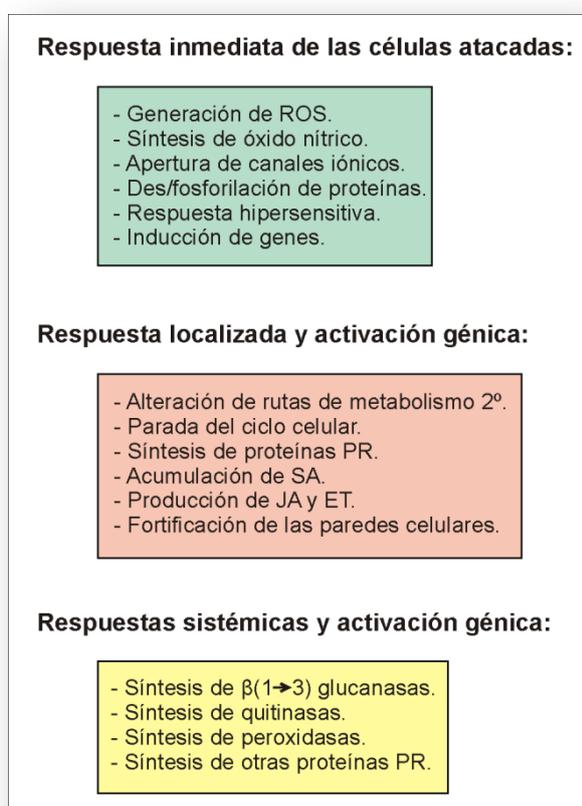


Figura 65. Representación esquemática de los eventos temporales que se suceden durante la activación de las defensas de la planta, tanto local como sistémica, desde el ataque del patógeno.

2.1.3. Inducción de las defensas de las plantas por parte de microorganismos beneficiosos.

Los microorganismos beneficiosos del suelo pueden inducir una respuesta sistémica de tipo ISR. De forma análoga a los PAMPs de los patógenos, los patrones moleculares asociados a microorganismos beneficiosos (MAMPs) son reconocidos por la planta, originando la activación de la respuesta ISR, aunque a un nivel más bajo que el provocado por patógenos (Pieterse *et al.*, 2009). La función de la respuesta inducida por MAMPs es la

de preparar a las células de la planta para desarrollar los mecanismos de defensa de modo más rápido frente a futuros ataques de patógenos (“*priming*”).

Determinadas especies dentro del género *Trichoderma* producen una gran variedad de MAMPs, como pueden ser proteínas o metabolitos secundarios. Como ejemplo, se ha demostrado la participación de la endopoligalacturonasa ThPG1 de *T. harzianum* en la colonización de la raíz de tomate y en la inducción de ISR en *Arabidopsis* (Morán-Diez *et al.*, 2009) y el papel del grupo de peptaiboles conocidos como trichokoninas producidas por *T. pseudokoningii* en la inducción de ROS, la acumulación de compuestos fenólicos y la resistencia a virus en plantas de tomate (Luo *et al.*, 2010). La respuesta temprana a MAMPs incluye cambios en flujos iónicos a través de la membrana celular, generación de ROS, ácido nítrico y ET y, más tarde, la deposición de callosa y la síntesis de compuestos antimicrobianos (Fig. 66) (Hermosa *et al.*, 2012; Shores *et al.*, 2010).

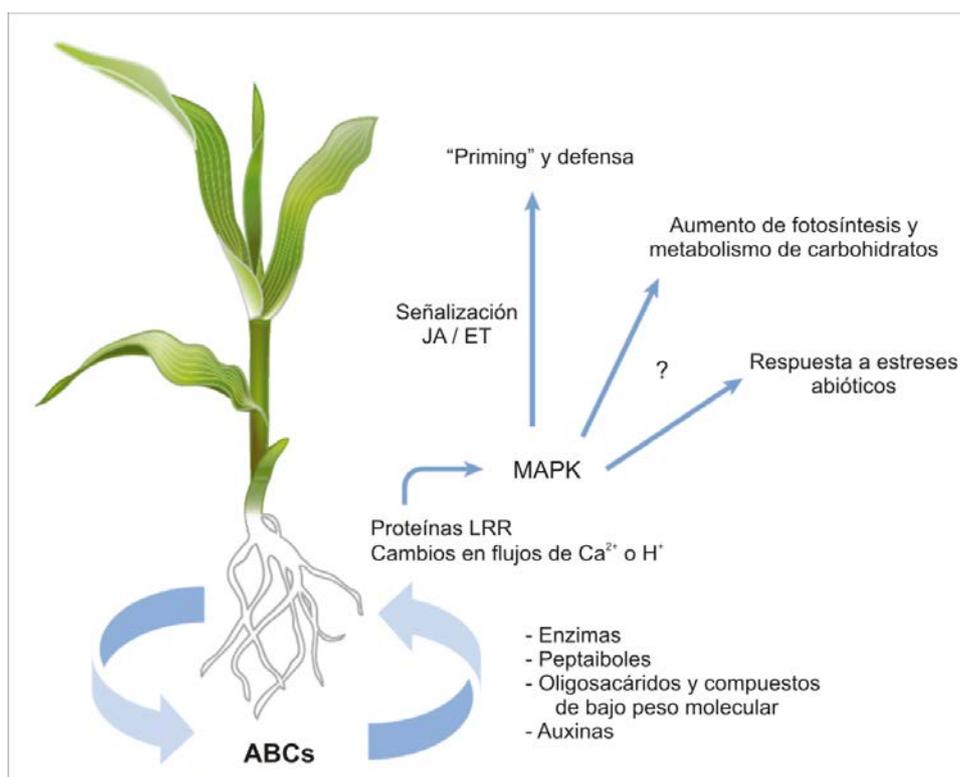


Figura 66. Representación de los efectos beneficiosos de *Trichoderma* como ACB. Al colonizar la raíz, el ACB y la planta intercambian señales. La cepa de *Trichoderma* libera elicitores que activan cascadas señalizadoras mediadas por MAPK. Estas cascadas culminan en la inducción de las defensas de la planta y “*priming*” (a través de la ruta del JA/ET), en la promoción del crecimiento mediante el incremento de la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos y en el aumento de la resistencia a estreses abióticos. En la rizosfera, *Trichoderma* ejerce un efecto biofertilizador y antagoniza a especies fitopatógenas. Imagen modificada de Shores *et al.*, 2010. Proteínas LRR: *Leucine Rich Repeats*.

El efecto de *Trichoderma* como inductor de las defensas de planta ha quedado demostrado en diversos experimentos, como por ejemplo:

- La aplicación de *T. harzianum* T39 en plantas de tomate, pimiento, tabaco, lechuga y alubia disminuye un 25-100% los síntomas de la podredumbre gris causada por *B. cinerea* en las hojas (De Meyer *et al.*, 1998).
- *T. virens* G-6, G-6-5 y G-11 protegen a las plantas de algodón e inducen en ellas la producción de fitoalexinas, disminuyendo en un 78% la enfermedad causada por *R. solani* (Howell *et al.*, 2000).

Al tratarse de microorganismos beneficiosos, no se espera que las cepas de *Trichoderma* tengan efecto sobre la respuesta SAR. Sin embargo, se ha visto que *T. asperellum* es capaz de inducir este tipo de resistencia sistémica en pepino (Segarra *et al.*, 2007). Esto indica de nuevo que las respuestas SAR e ISR están interconectadas y que aún queda mucho por conocer para poder dilucidar su mecanismo de acción completo.

OBJETIVOS

- ✎ Evaluar la aplicación de la cepa Ta37 y los mutantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 como cepas de biocontrol en plantas de tomate infectadas con el patógeno *B. cinerea*, analizando el efecto de dicho tratamiento sobre los siguientes parámetros:
 - Lesiones provocadas por *B. cinerea* en hojas de plantas de tomate.
 - Desarrollo de las plantas de tomate.
 - Defensas de las plantas cuando son infectadas por *B. cinerea*.

RESULTADOS

Una vez demostrada la actividad antifúngica del HA se quiso estudiar la capacidad de Ta37 para actuar como agente de biocontrol una vez aplicada a plantas de tomate. Los experimentos realizados se centraron en los posibles efectos de la cepa Ta37 y de los mutantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5 en la promoción del crecimiento de las plantas de tomate y en la inducción de las respuestas de defensa de dichas plantas frente a ataques de patógenos.

1. Cultivos hidropónicos de plantas de tomate en presencia de la cepa Ta37.

El primer aspecto que se determinó fue si la interacción con las plantas de tomate ejercía algún efecto sobre la expresión de los genes *tri* y sobre la producción de HA en la cepa Ta37. Para ello se realizaron cultivos hidropónicos de plantas de tomate en cuyo medio de cultivo se añadió Ta37, lo cual permitió recuperar el micelio de esta cepa adherido a las paredes de las raíces de las plantas y comprobar el nivel de expresión de los genes *tri* en interacción con dichas plantas. Así, en cajas Phytatray II (Sigma, St. Louis, MO) transparentes se cultivaron 30 semillas estériles de tomate var. Marmande con 100 ml de medio MS. A las 2 semanas, cuando las raíces estaban ya sumergidas en el medio MS, se añadió micelio de la cepa Ta37 crecido durante 2 días en PDBs y se incubó en agitación durante 20h. Transcurrido ese tiempo se recogió el micelio adherido a las raíces y se analizó la expresión de los genes *tri* mediante qPCR. Es importante indicar que en este periodo de tiempo las plantas inoculadas no presentaron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas control sin inocular.

La expresión de los genes *tri4* y *tri11* se vio incrementada por un factor de 2,7 ($p=0,000$) y 2,9 ($p=0,000$), respectivamente, cuando la cepa Ta37 estaba en presencia de las plantas de tomate en comparación con cuando crecía aislada, sin embargo la expresión del resto de los genes *tri* no experimentaba variaciones significativas (Fig. 67). Estos datos permitieron concluir que el nivel de producción de HA no sería diferente en presencia de las plantas: ni aumentaba como cabría esperar si se tratase de un factor de virulencia de Ta37

ni su producción era inhibida por las plantas de tomate, indicando la inocuidad del HA para las mismas.

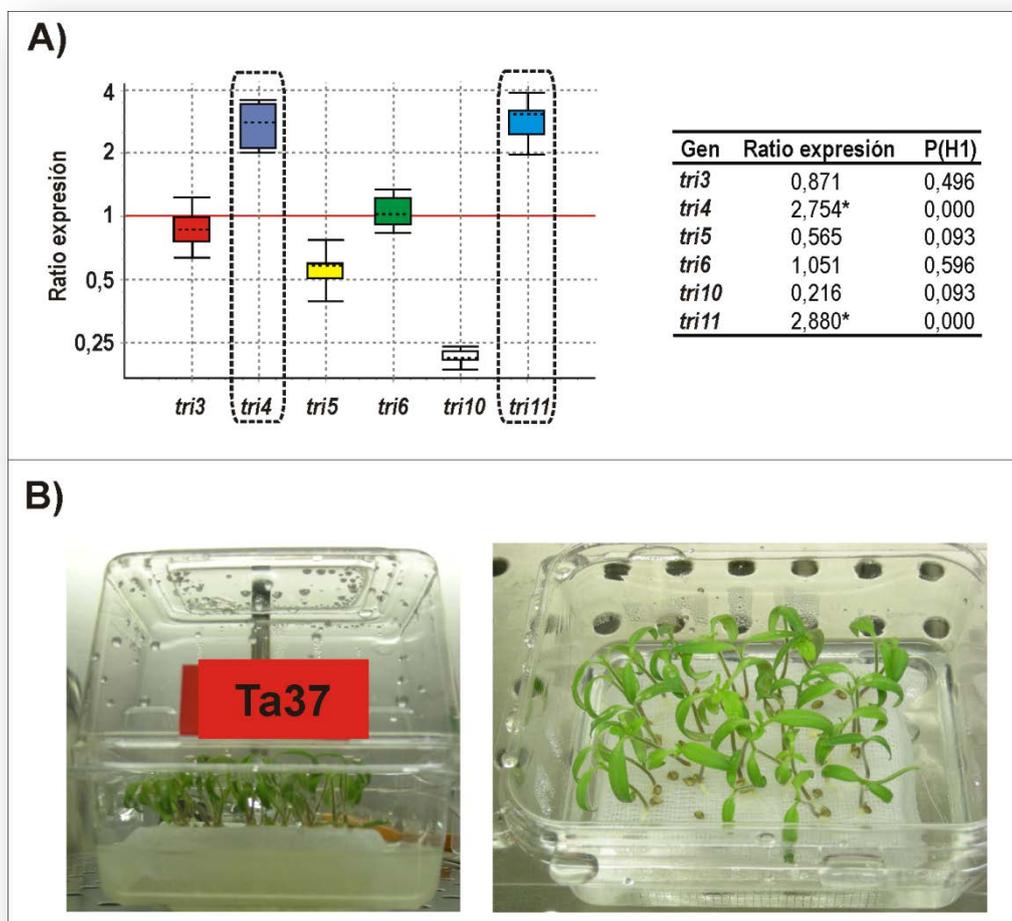


Figura 67. **A)** Estudio de expresión de los genes *tri* de Ta37 creciendo en contacto con plantas de tomate. Los datos obtenidos mediante qPCR fueron analizados con el software REST2009. Los genes cuyo nivel de expresión fue significativamente diferente al de la cepa creciendo aislada ($n=3$; $p<0,05$) se indican con un recuadro punteado en el gráfico o con un asterisco en la tabla de datos. **B)** Cultivo hidropónico de plantas de tomate inoculadas con Ta37.

2. Efecto de las diferentes cepas de *Trichoderma* en el desarrollo de las plantas de tomate.

Como se ha indicado en la introducción, algunas especies del género *Trichoderma* son conocidas por ejercer su capacidad de biocontrol mediante la promoción del crecimiento y del desarrollo de las plantas tratadas con ellas. Sin embargo, hay que ser muy cuidadoso a la hora de asignar estas propiedades beneficiosas a *Trichoderma* ya que, como se ha

demostrado recientemente, los efectos observados no sólo dependen de la cepa fúngica aplicada sino también de la especie de planta tratada e incluso de la variedad vegetal estudiada (Tucci *et al.*, 2011). Basándonos en esto, estudiamos el efecto de la cepa Ta37 y del mutante Ta Δ Tri5 sobre el desarrollo de 3 variedades diferentes de tomate: Marmande, Tres Cantos y Muchamiel.

Semillas pildoradas con esporas de las 2 cepas de *Trichoderma* se cultivaron sobre sustrato en una cámara de incubación a 21,5 °C, 60% humedad y 16h de fotoperiodo durante 4 semanas. Transcurrido este tiempo se analizaron los parámetros de porcentaje de germinación y longitud y diámetro del tallo, sin observarse diferencias significativas ni entre las plantas control y las tratadas ni entre los diferentes tratamientos aplicados (Tabla 19).

Variedad tomate	Parámetro	H ₂ O (control)	Ta37	Ta Δ Tri5
Marmande	Altura parte aérea (cm)	16,56 \pm 5,62	16,22 \pm 4,15	14,21 \pm 4,15
	Grosor planta (mm)	3,85 \pm 1,07	4,30 \pm 1,21	3,94 \pm 1,12
	Tasa germinación (%)	92,97 \pm 1,09	84,64 \pm 4,79	87,08 \pm 9,15
Tres Cantos	Altura parte aérea (cm)	19,73 \pm 2,13	18,08 \pm 2,30	18,02 \pm 3,21
	Grosor planta (mm)	5,21 \pm 0,74	5,19 \pm 0,65	5,32 \pm 0,70
	Tasa germinación (%)	96,87 \pm 3,12	93,75 \pm 6,25	93,75 \pm 6,25
Muchamiel	Altura parte aérea (cm)	19,13 \pm 2,48	20,01 \pm 3,23	21,69 \pm 5,39
	Grosor planta (mm)	5,12 \pm 0,57	5,02 \pm 0,89	4,92 \pm 0,92
	Tasa germinación (%)	79,47 \pm 8,04	93,30 \pm 4,46	82,14 \pm 17,86

Tabla 19. Parámetros relativos al desarrollo de la planta estudiados en plantas de tomate de 3 variedades diferentes tratadas o no con las cepas de *Trichoderma*.

3. Efecto de *Trichoderma* sobre las lesiones foliares causadas por *B. cinerea* en plantas de tomate.

Como se demostró en el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral, la cepa Ta37 tenía la capacidad de inhibir el crecimiento del fitopatógeno *B. cinerea*, capacidad condicionada en

gran medida a la producción de HA, por lo que se quiso demostrar si esta cepa podría ser empleada para el control de la enfermedad causada por dicho patógeno en plantas de tomate.

Para ello se tomaron hojas de tomate de plantas crecidas durante 3 semanas y se infectaron con esporas de *B. cinerea*. Sobre el punto de infección se añadieron sobrenadantes esterilizados por filtración de las diferentes cepas de *Trichoderma* y se registró el diámetro de las lesiones a las 48 y a las 72h (Tabla 20, Fig. 68).

Variedad	Tiempo	Control	Ta37	TaΔTri4	TaΔTri5
Marmande	48h	5,13 ^a ± 1,31	0,99 ^c ± 1,38	0,77 ^c ± 1,15	1,46 ^b ± 1,14
	72h	6,96 ^a ± 2,02	1,16 ^c ± 1,55	1,31 ^c ± 1,58	2,72 ^b ± 1,86
Tres Cantos	48h	4,58 ^a ± 0,93	0,04 ^d ± 0,20	0,97 ^c ± 1,23	1,38 ^b ± 1,19
	72h	6,46 ^a ± 1,73	0,29 ^d ± 0,69	1,43 ^c ± 1,37	2,71 ^b ± 1,71
Muchamiel	48h	4,76 ^a ± 1,13	0,28 ^d ± 0,56	0,75 ^c ± 1,00	1,49 ^b ± 1,12
	72h	6,54 ^a ± 2,15	0,58 ^d ± 1,02	1,44 ^c ± 1,43	3,07 ^b ± 2,02

Tabla 20. Diámetro (en mm) de las lesiones foliares causadas por *B. cinerea* en plantas de tomate. Letras distintas en los superíndices indican valores estadísticamente diferentes para cada variedad de planta estudiada y por tiempo analizado (valores señalados también con diferentes sombreados para facilitar la comprensión de la tabla) (ANOVA, Test Duncan, n=71, p<0,05).

Estos resultados demostraron que todas las cepas de *Trichoderma* estudiadas reducían significativamente el tamaño de las lesiones causadas por *B. cinerea*, siendo mucho mayor esta reducción al emplear la cepa Ta37, hecho indicativo del papel fundamental que juega el HA en las interacciones que establece *Trichoderma*, aunque quedando de manifiesto la participación de otro tipo de metabolitos en la reducción de la extensión de la enfermedad causada por el patógeno ya que, incluso al tratar con el mutante TaΔTri5, las lesiones continuaban siendo como mínimo un 50% más pequeñas que en plantas sin tratar.

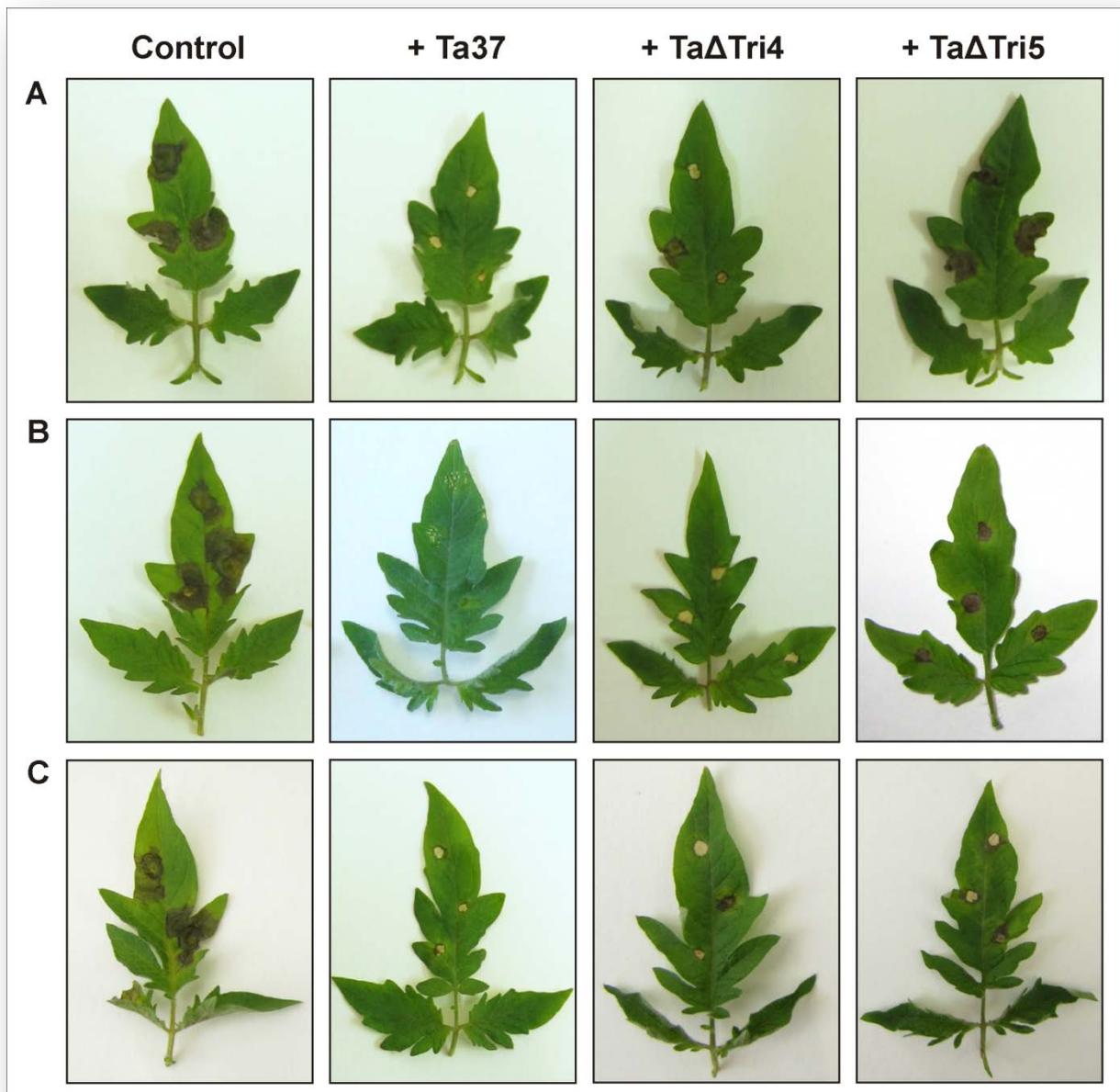


Figura 68. Lesiones foliares causadas por *B. cinerea* en diferentes variedades de plantas de tomate, tras el tratamiento con sobrenadantes de las diferentes cepas de *Trichoderma*. Variedades de tomate empleadas: Marmande (A), Tres Cantos (B) y Muchamiel (C).

4. Inducción de las respuestas defensivas en plantas de tomate.

Tras el estudio del efecto de la aplicación de las diferentes cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de plantas de tomate y sobre el desarrollo de lesiones foliares

provocadas por *B. cinerea*, se quiso estudiar en profundidad el efecto de dicha aplicación sobre las respuestas defensivas en las plantas de tomate var. Marmande.

Para ello se pildoraron semillas de tomate con esporas de la cepa Ta37 o de los mutantes Ta Δ Tri4 o Ta Δ Tri5 y las plantas se cultivaron durante 4 semanas en una cámara de incubación bajo las condiciones indicadas anteriormente. Transcurrido ese tiempo, se tomó una hoja (que se congeló inmediatamente a -80°C hasta su uso) y se infectó con *B. cinerea* otra hoja de la misma planta y del mismo nivel que la anterior. Las plantas infectadas se mantuvieron en condiciones de alta humedad durante 4 días tras los cuales se tomaron las hojas infectadas. Se extrajo el ARN de todas las hojas y se analizó mediante qPCR la expresión de varios genes de defensa de las plantas, implicados tanto en la ruta del salicilato (SA; genes PR1b1 y PR-P2) como del jasmonato (JA; genes PINI, PINII y TomLoxA).

Una vez obtenidos los datos de expresión, se estudiaron en las siguientes situaciones:

- Expresión de los genes en plantas infectadas con *B. cinerea* en comparación con plantas sin infectar (condición 1). Este análisis nos permitió determinar el efecto del patógeno sobre los genes de defensa de la planta.
- Expresión de los genes en plantas tratadas con *Trichoderma* e infectadas con *B. cinerea* en comparación con plantas tratadas pero no infectadas (condición 2). De este modo describimos el efecto del patógeno sobre las plantas previamente tratadas con *Trichoderma*.
- Expresión de los genes en plantas tratadas con *Trichoderma* sin infectar en comparación con plantas sin tratar ni infectar (condición 3). Así se analizó el efecto de *Trichoderma* sobre los genes de defensa.
- Expresión de los genes en plantas tratadas con *Trichoderma* e infectadas con *B. cinerea* en comparación con plantas sin tratar ni infectar (condición 4). Este estudio nos proporcionó una visión global de lo que ocurría cuando una planta tratada con *Trichoderma* era infectada por *B. cinerea*.

Como se muestra en las figuras 69 y 70., *B. cinerea* (condición 1) inducía los genes de la vía del JA y la cepa Ta37 (condición 3) inducía la expresión de los genes PR1b1 (SA) y PINI y PINII (JA). En las plantas tratadas con Ta37, tras ser infectadas por *B. cinerea*

(condición 2), todos los genes estudiados, tanto de la ruta del SA como del JA, se veían inducidos. Por último, al analizar la expresión de los genes en plantas tratadas con Ta37 e infectadas por el patógeno con respecto a las plantas sin tratar ni infectar (condición 4) se observó una drástica inducción de todos los genes estudiados (Tabla 21).

Genes	1 -Ta37 +Bc / -Ta37 -Bc		2 +Ta37 +Bc / +Ta37 -Bc		3 +Ta37 -Bc / -Ta37 -Bc		4 +Ta37 +Bc / -Ta37 -Bc	
	Ratio expresión	P(H1)						
PR1b1	0,445	0,068	11,519*	0,000	2,503*	0,000	28,835*	0,000
PR-P2	1,305	0,134	31,029*	0,000	2,990	0,063	92,761*	0,000
PINI	13,506*	0,000	22,112*	0,016	5,541*	0,043	122,512*	0,000
PINII	6,637*	0,024	10,268*	0,000	10,931*	0,031	112,233*	0,000
TomLoxA	5,207*	0,019	12,224*	0,000	1,606	0,064	16,630*	0,030

Tabla 21. Nivel de expresión relativa de genes de respuesta defensiva en plantas de tomate tratadas o no con Ta37 e infectadas o no con *B. cinerea*. Datos obtenidos mediante qPCR y analizados empleando el software REST2009. Los valores indicados con un asterisco son significativamente diferentes a la condición control ($p < 0,05$; $n=3$). P(H1): probabilidad de que la hipótesis alternativa (diferencia entre las muestras) sea debida exclusivamente al azar.

En el caso del mutante Ta Δ Tri4, los resultados de la expresión relativa de los genes de defensa indicaron que el nivel de inducción de la expresión de los genes de ambas rutas fue significativamente menor que cuando la cepa aplicada fue la Ta37 (Fig. 69). Algunos genes que se veían inducidos en interacción con Ta37 eran reprimidos en presencia del mutante Ta Δ Tri4. Así, el gen PINII era reprimido por un factor de 0,635 ($p=0,024$) en plantas tratadas con el mutante e infectadas con *B. cinerea* (condición 2), mientras que en la misma condición pero empleando la cepa Ta37, este gen se vio inducido por un factor de 10,268 ($p=0,000$). Las mayores diferencias en el nivel de expresión relativa de los genes obtenidas entre las plantas tratadas con Ta37 o con Ta Δ Tri4 se observaron en la condición 4, al comparar la expresión de los genes en plantas tratadas con una de esas 2 cepas e infectadas con el patógeno con plantas sin tratar ni infectar. Bajo estas condiciones, todos los genes analizados de las rutas del SA y del JA se expresaron a mayor nivel en las plantas tratadas con Ta37 (Tabla 22).

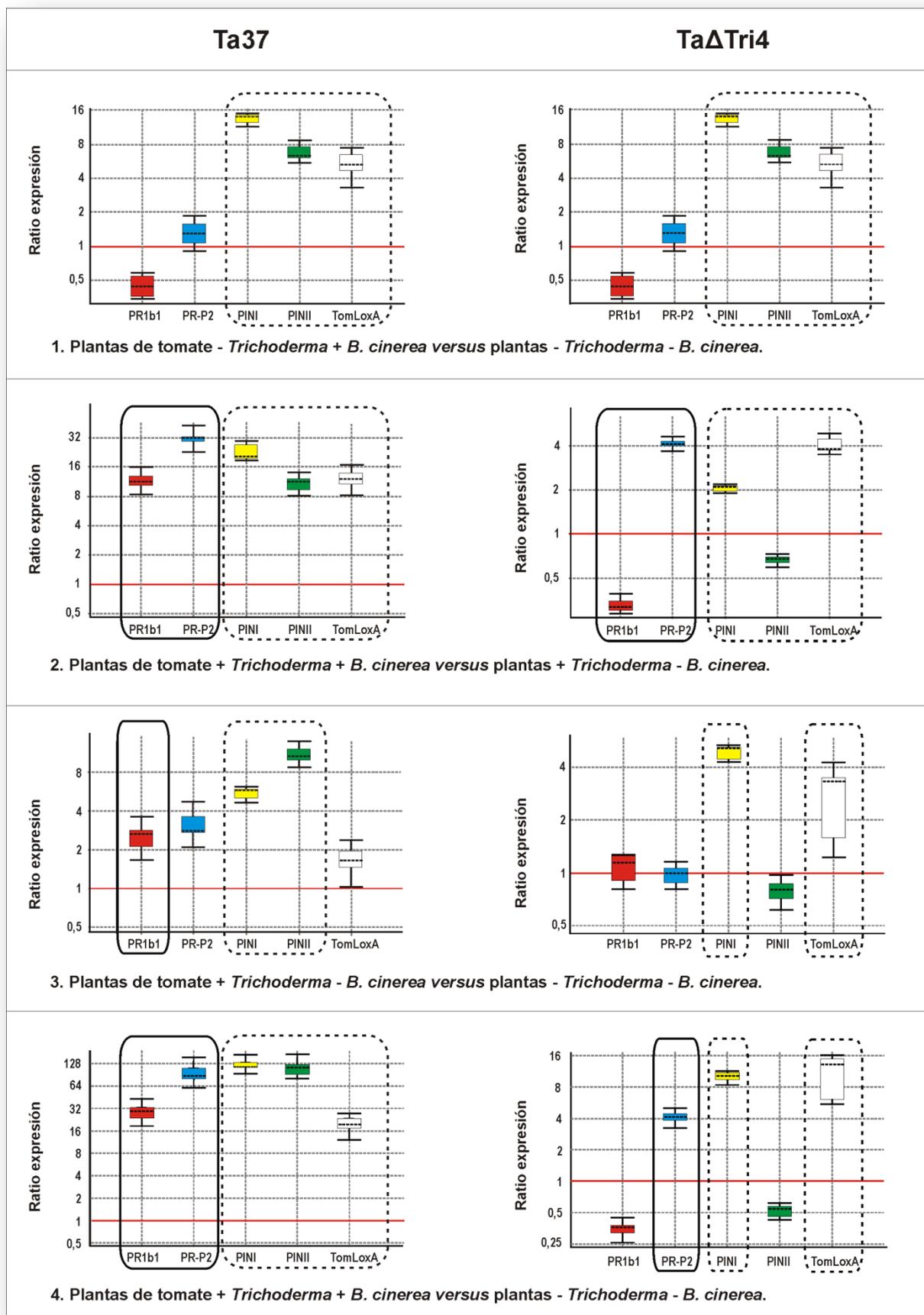


Figura 69. Estudio mediante qPCR el que se compara la expresión de los genes pertenecientes a las rutas del salicilato (SA) y del jasmonato/etileno (JA/ET) en plantas de tomate infectadas o no con *B. cinerea*, empleando plantas que habían sido pre-tratadas con esporas de Ta37 o TaΔTri4. Los genes cuya diferencia de expresión es estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0,05$; $n=3$) se indican con un recuadro continuo para los genes del SA y punteado para los genes del JA/ET. Datos analizados mediante el software REST2009.

Genes	1 -TaΔTri4 +Bc / -TaΔTri4 -Bc		2 +TaΔTri4 +Bc / +TaΔTri4 -Bc		3 +TaΔTri4 -Bc / -TaΔTri4 -Bc		4 +TaΔTri4 +Bc / -TaΔTri4 -Bc	
	Ratio expresión	P(H1)						
PR1b1	0,445	0,068	0,300*	0,044	1,082	0,628	0,325	0,100
PR-P2	1,305	0,134	4,792*	0,042	0,969	0,730	4,645*	0,029
PINI	13,506*	0,000	2,345*	0,033	5,224*	0,014	12,296*	0,000
PINII	6,637*	0,024	0,635*	0,024	0,765	0,066	0,486	0,081
TomLoxA	5,207*	0,019	5,127*	0,009	2,292*	0,000	11.750*	0,000

Tabla 22. Nivel de expresión relativa de genes de respuesta defensiva en plantas de tomate tratadas o no con TaΔTri4 e infectadas o no con *B. cinerea*. Datos obtenidos mediante qPCR y analizados empleando el software REST2009. Los valores indicados con un asterisco son significativamente diferentes a la condición control ($p < 0,05$; $n=3$). P(H1): probabilidad de que la hipótesis alternativa (diferencia entre las muestras) sea debida exclusivamente al azar.

Al estudiar el efecto provocado por el mutante TaΔTri5 se vio que el tratamiento con esta cepa (condición 3) provocaba la represión de todos los genes analizados (Fig. 70). Cuando las plantas fueron tratadas con TaΔTri5 e infectadas con *B. cinerea* (condición 4), todos los genes sufrieron una ligera inducción. Sin embargo, en el caso de este mutante, solamente los genes pertenecientes a la ruta del SA se vieron positivamente sensibilizados ya que su nivel de expresión fue mayor que en las condiciones 1 y 3, mientras que la expresión de los genes del JA no superaron el nivel de expresión provocado por la infección de *B. cinerea* (condición 1), de hecho, se expresaron a más bajo nivel, indicando que el mutante TaΔTri5 no era capaz de sensibilizar a las plantas de tomate frente a *B. cinerea* a través de la ruta del JA (Tabla 23).

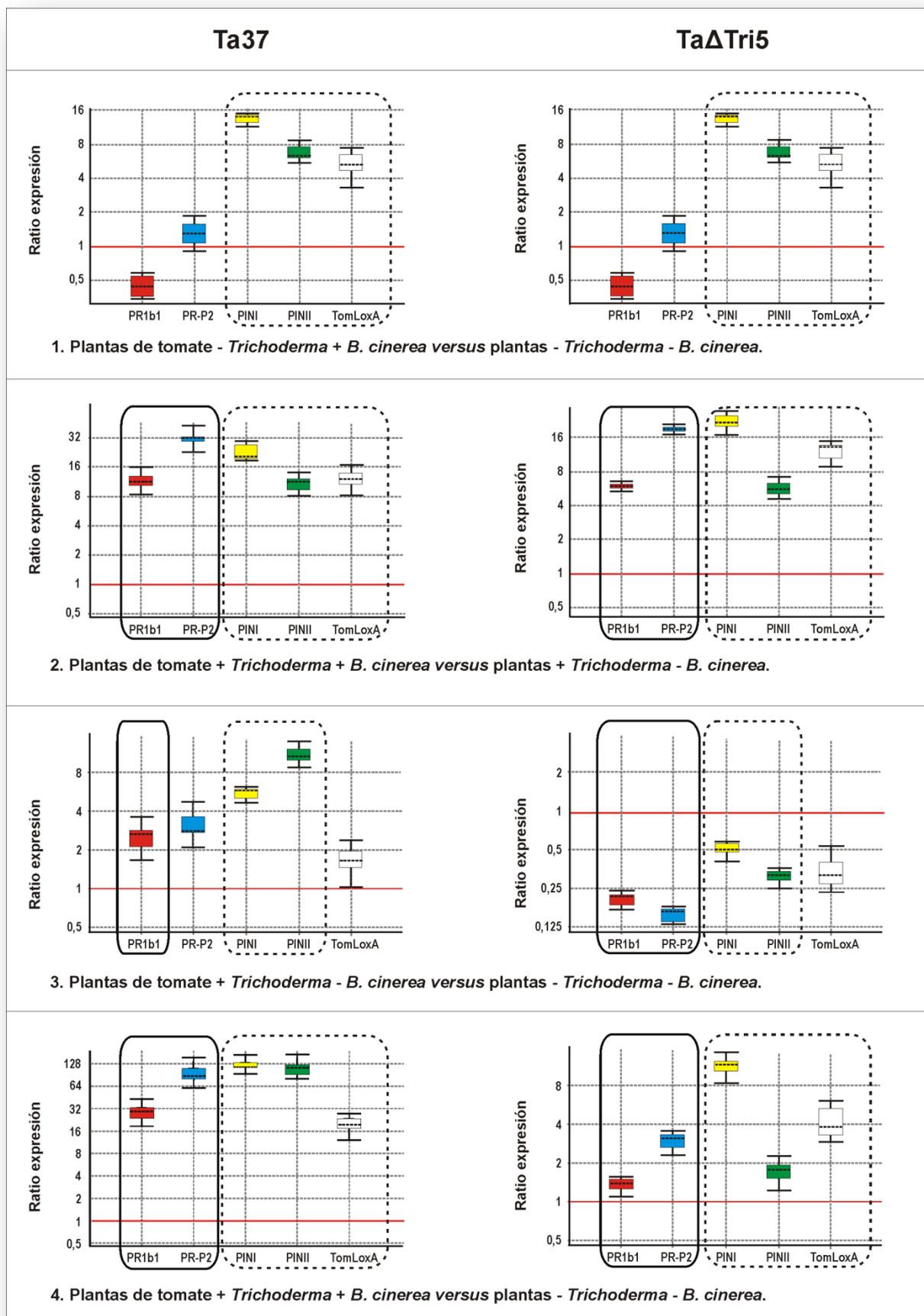


Figura 70. Estudio mediante qPCR el que se compara la expresión de los genes pertenecientes a las rutas del salicilato (SA) y del jasmonato/etileno (JA/ET) en plantas de tomate infectadas o no con *B. cinerea*, empleando plantas que habían sido pre-tratadas con esporas de Ta37 o Ta Δ Tri5. Los genes cuya diferencia de expresión es estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0,05$; $n=3$) se indican con un recuadro continuo para los genes del SA y punteado para los genes del JA/ET. Datos analizados mediante el software REST2009.

Genes	1 -Ta Δ Tri5 +Bc / -Ta Δ Tri5 -Bc		2 +Ta Δ Tri5 +Bc / +Ta Δ Tri5 -Bc		3 +Ta Δ Tri5 -Bc / -Ta Δ Tri5 -Bc		4 +Ta Δ Tri5 +Bc / -Ta Δ Tri5 -Bc	
	Ratio expresión	P(H1)						
PR1b1	0,445	0,068	6,298*	0,000	0,206*	0,000	1,295*	0,000
PR-P2	1,305	0,134	18,284*	0,048	0,160*	0,000	2,927*	0,000
PINI	13,506*	0,000	21,164*	0,000	0,518*	0,000	10,953*	0,000
PINII	6,637*	0,024	5,549*	0,000	0,307*	0,000	1,705*	0,000
TomLoxA	5,207*	0,019	12,221*	0,000	0,340	0,075	4,152*	0,000

Tabla 23. Nivel de expresión relativa de genes de respuesta defensiva en plantas de tomate tratadas o no con Ta Δ Tri5 e infectadas o no con *B. cinerea*. Datos obtenidos mediante qPCR y analizados empleando el software REST2009. Los valores indicados con un asterisco son significativamente diferentes a la condición control ($p < 0,05$; $n=3$). P(H1): probabilidad de que la hipótesis alternativa (diferencia entre las muestras) sea debida exclusivamente al azar.

DISCUSIÓN

En anteriores trabajos nuestro grupo había demostrado la actividad fitotóxica de la trichodermina, el otro tipo de trichoteceno (aparte del HA) producido por el género *Trichoderma*, lo cual imposibilitó el empleo de su cepa productora, *T. brevicompactum* IBT 40841, como agente de biocontrol a pesar de la buena actividad de la trichodermina como agente antimicrobiano (Tijerino *et al.*, 2011a,b). Sin embargo, a pesar de la naturaleza similar del HA, ni en cultivos hidropónicos ni sobre sustrato se encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento medidos en plantas control y en plantas tratadas con Ta37, sugiriendo que el HA no afectaba al desarrollo de las plántulas bajo las condiciones empleadas. Al analizar la expresión de los genes *tri* en la cepa Ta37 en contacto con la raíz de las plantas de tomate, se observó un incremento en los niveles de expresión de los genes *tri4* y *tri11* aunque el nivel de producción de HA no se vería incrementado ya que el gen *tri5* se vio ligeramente reprimido por un factor de 0,56 ($p=0,09$). La no inducción de la producción de HA en presencia de plantas de tomate indicaba que, efectivamente, este compuesto no era un factor de virulencia empleado por Ta37 para dañar a dichas plantas y, por tanto, quedó demostrada la inocuidad del HA para las plantas de tomate, bajo las condiciones estudiadas.

En el desarrollo de una hipótesis que explicase el modo en que la cepa Ta37 pudiera ser empleada como un ACB frente a la invasión de plantas por parte de hongos fitopatógenos, se ha demostrado en este trabajo que el HA reduce el crecimiento de los patógenos *B. cinerea* y *R. solani*, así como el tamaño de las lesiones foliares en plantas de tomate provocadas por el primero de los patógenos, y que dicho compuesto no es tóxico para las plantas. El siguiente paso consistió en estudiar el efecto de las diferentes cepas de *Trichoderma* sobre los genes de defensa implicados en las rutas del SA y del JA en plantas de tomate crecidas durante 4 semanas en una cámara de incubación, previamente tratadas o no con *Trichoderma* e infectadas o no con el patógeno foliar *B. cinerea*. Este tipo de experimento nos indicaría si la presencia de estas cepas incrementaría la intensidad de la respuesta de la planta frente a *B. cinerea*, en un efecto sensibilizador similar al descrito en otras especies de *Trichoderma* empleadas como ACBs (Ahn *et al.*, 2007; Conrath *et al.*, 2006).

Tras 4 días de la inoculación de *B. cinerea* en hojas de tomate, la expresión de los genes de la ruta del JA se vio incrementada en un intento de detener la infección por parte del patógeno (condición 1). Sin embargo, si las plantas habían sido tratadas previamente con la cepa Ta37 (condición 2), no sólo el incremento en la expresión de estos genes era mayor sino que también se inducían los genes de la ruta del SA. Como condición basal, en plantas tratadas con Ta37 pero sin infectar con *B. cinerea* (condición 3) ya se observaba un incremento en la expresión de algunos de los genes de ambas rutas, lo que indicaría que Ta37 desencadenaría una inducción en la respuesta defensiva en plantas de tomate, preparando a las mismas para el posible ataque de un patógeno de modo que pudiera responder a él de un modo más rápido y potente. Este efecto sensibilizador se hizo más patente al comparar la expresión de los genes en plantas tratadas con Ta37 e infectadas por *B. cinerea* frente a plantas sin tratar ni infectar (condición 4). En este caso, la expresión de los genes se vio drásticamente incrementada generando en la planta un nivel defensivo frente a *B. cinerea* mucho mayor a cuando la planta no ha sido tratada con Ta37 (Fig. 71.A).

Sin embargo, al tratar las plantas con los mutantes Ta Δ Tri4 y Ta Δ Tri5, el nivel de inducción de los genes de defensa en la condición 4 fue mucho menor, indicando que el HA podría tener una función importante en la sensibilización de las plantas de tomate frente a hongos fitopatógenos. Este nuevo papel del HA fue confirmado al comparar la inducción de los genes del SA y del JA en plantas tratadas con Ta37 e infectadas con *B. cinerea* frente a plantas sin tratar pero que habían sido infectadas por el patógeno (condición 3). La diferencia en el nivel de expresión de los genes en esta condición indicaba el efecto sensibilizador de Ta37, reflejado en la inducción de todos los genes estudiados. Sin embargo, cuando la cepa empleada fue Ta Δ Tri4, solamente los genes PR-P2 y TomLoxA se vieron ligeramente inducidos mientras que al aplicar el mutante Ta Δ Tri5 los genes se expresaron incluso a menor nivel, es decir se reprimieron ligeramente, indicando que cuando el HA no era producido, la función sensibilizadora de Ta37 desaparecía por completo. De este modo quedó demostrado que el HA contribuía de forma necesaria en la sensibilización de la planta frente a hongos fitopatógenos, aunque no era el único responsable de este efecto ya que el mutante Ta Δ Tri5, que no produce HA, sigue manteniendo un efecto inductor significativo sobre los genes relacionados con la ruta del SA (Fig. 71.B). Esta es una importante diferencia en comparación con el mutante Ta Δ Tri4, el cual produce una serie de intermediarios de la síntesis del HA pero no ejerce efecto sensibilizador alguno sobre las plantas de tomate.

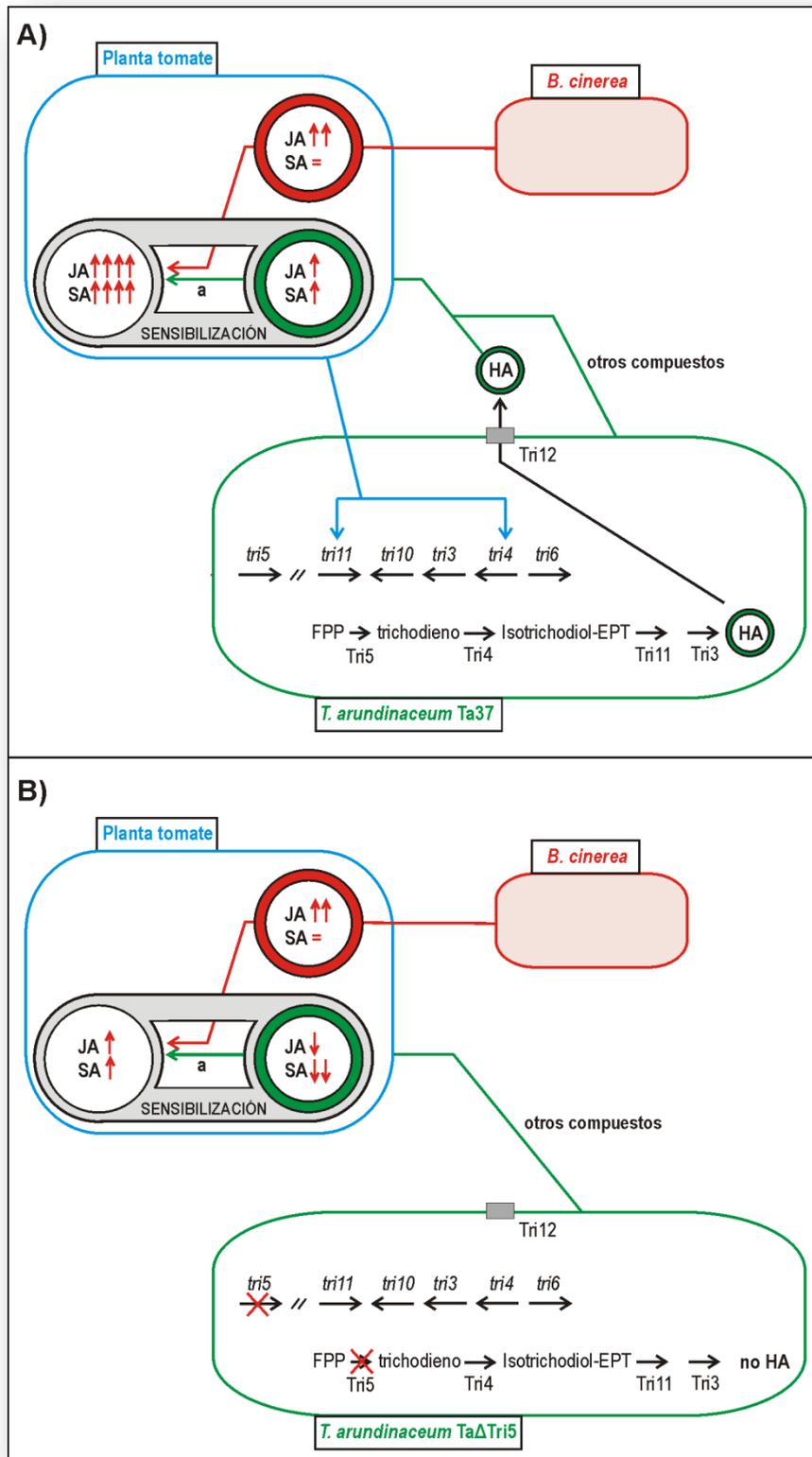


Figura 71. Representación esquemática de las relaciones establecidas entre las plantas de tomate y las cepas Ta37 (A) y TaΔTri5 (B). Las flechas azules indican la inducción de los genes *tri4* y *tri11* por parte de las plantas de tomate. En rojo se muestra el efecto que produce la infección por parte de *B. cinerea* sobre las defensas de la planta. Las líneas verdes representan la acción que ejerce *Trichoderma* sobre los genes de defensa de las plantas de tomate, por medio de la producción de HA y/o de otros metabolitos, traduciéndose en un mayor o menor efecto sensibilizador (a).

Teniendo en cuenta todos los datos recopilados hasta el momento, se propuso una red de interacciones que se establecerían entre la planta de tomate, el agente de biocontrol Ta37 y el fitopatógeno *B. cinerea* (Fig. 72), en la cual Ta37 sensibiliza a la planta mediante la inducción de sus genes de defensa para que actúen de modo más rápido y contundente cuando comienza la invasión por *B. cinerea*. En esta relación ecológica, cada uno de los organismos ejerce algún tipo de efecto sobre los demás y los metabolitos secundarios presentan un papel fundamental en estas interacciones:

- **Trichoderma:** la cepa empleada a lo largo de este trabajo es capaz de inhibir el crecimiento del patógeno *B. cinerea* mediante la producción del trichoteceno HA y de enzimas hidrolíticas extracelulares, que actuarían sinérgicamente entre ellos. Además, ha quedado demostrado el papel del HA como represor de algunos genes de virulencia de *B. cinerea*, entre los que se incluyen los genes de biosíntesis del botridial, fitotoxina sintetizada por este patógeno, cuya producción se ve reducida en presencia de la cepa Ta37.

Aparte del efecto sobre el patógeno, Ta37 también actúa sobre los genes de defensa de las plantas de tomate, induciendo la expresión tanto de genes implicados en la ruta del SA como del JA/ET. Dicha inducción también se ve potenciada por la producción de HA ya que el efecto sensibilizador producido por el mutante Ta Δ Tri5 es mucho menor que el generado por la cepa Ta37.

Todo esto lleva a la conclusión de que la presencia de Ta37 ejerce un efecto muy beneficioso sobre las plantas de tomate ya que, además de disminuir la población de *B. cinerea* y de hacerla menos virulenta, prepara a las plantas para reaccionar más eficazmente frente al patógeno.

- ***B. cinerea*:** su presencia, como la de cualquier fitopatógeno, induce los genes de defensa de la planta, en este caso los genes de respuesta tipo ISR.

Aunque no es capaz de inhibir el crecimiento de la cepa Ta37, el contacto entre ambos hongos provoca cambios sobre la producción de HA. Es importante matizar este concepto ya que la simple presencia del patógeno hace que se dispare la biosíntesis de HA, sin embargo, en la zona de interacción entre Ta37 y un mutante de *B. cinerea* no productor de botridial, la cantidad de HA producido es mucho mayor que cuando Ta37 se enfrenta a un productor de botridial, lo cual sería indicativo de que la cepa Ta37 se “defendería” de la presencia de un hongo competidor induciendo la síntesis de

HA mientras que *B. cinerea* intentaría reducir la producción de este antifúngico mediante la represión de los genes *tri* ejercida por el botridial.

- **Planta de tomate:** también influye sobre la cepa Ta37 como demuestra la inducción de los genes *tri4* y *tri11* en micelio en contacto con raíces de las plantas en cultivos hidropónicos, aunque presumiblemente esta inducción no sea suficiente como para alterar el nivel de producción de HA.

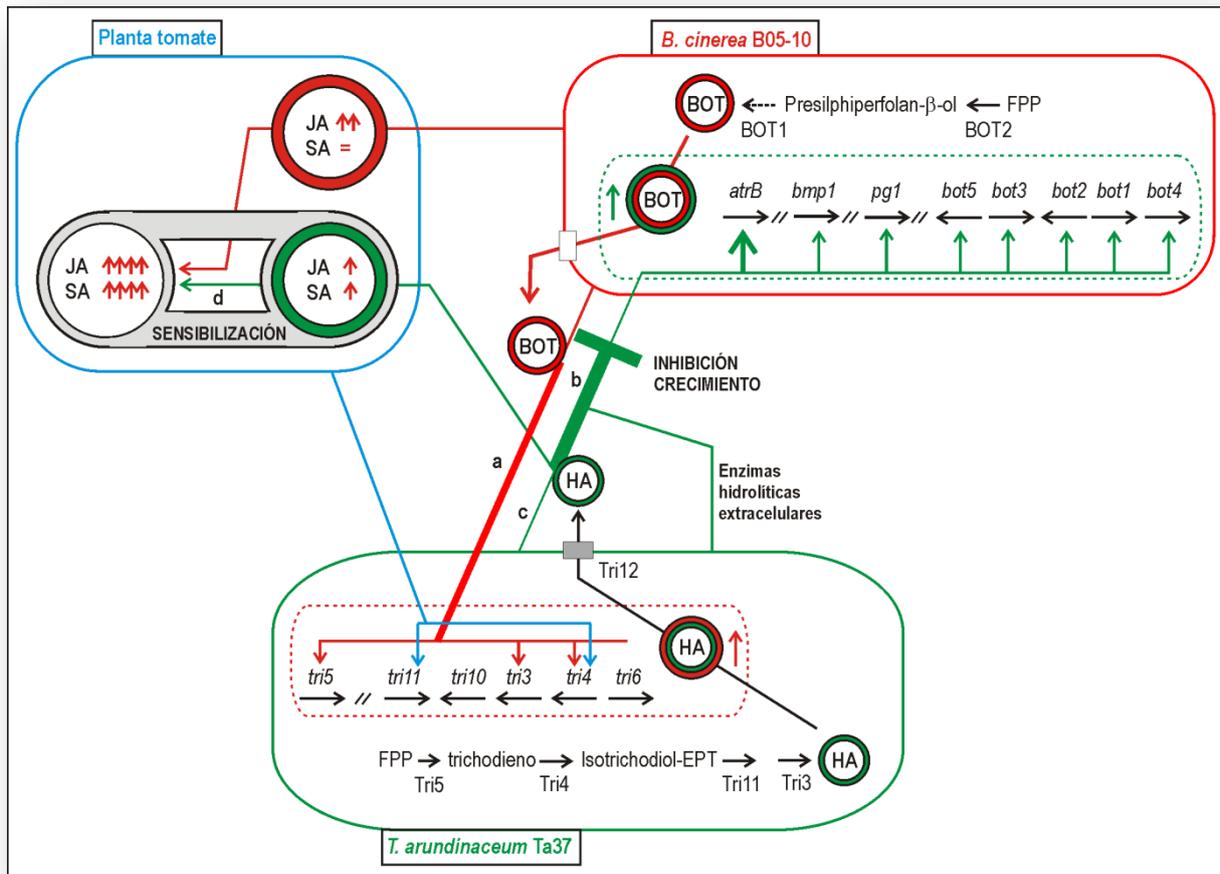


Figura 72. Representación esquemática de la red de interacciones establecida entre Ta37, *B. cinerea* y las plantas de tomate deducida del presente trabajo. Las flechas indican una respuesta estimuladora o la inducción de genes mientras que las líneas con extremos romos señalan la represión de genes o una inhibición del crecimiento. Las líneas rojas, azules y verdes indican las interacciones mediadas por *B. cinerea*, por la planta de tomate y por Ta37, respectivamente. a.- acción del botridial y otros metabolitos producidos por *B. cinerea* que participan en la interacción con sus hongos antagonistas; b.- acción conjunta del HA y de las enzimas hidrolíticas sobre el crecimiento de *B. cinerea*; c.- otros metabolitos producidos por Ta37 que, junto con el HA, participarían en las interacciones con plantas y con sus hongos diana; d.- efecto sensibilizador del HA sobre las plantas pre-tratadas con Ta37.

Como ha quedado demostrado al emplear el mutante Ta Δ Tri5, además del HA, otros metabolitos y/o enzimas producidas por *Trichoderma* participarían en la sensibilización de la planta. Estos compuestos no han sido identificados de momento, y puede que surjan de la canalización del FPP, que no está siendo procesado a través de la ruta de los trichotecenos, hacia otros compuestos terpénicos. De hecho, el nivel de producción de ergosterol (compuesto sintetizado a partir de FPP y cuya función principal es la de actuar como constituyente de la membrana celular fúngica) es mayor en el mutante Ta Δ Tri5 que en la cepa silvestre o que en el otro mutante Ta Δ Tri4. En la actualidad el ergosterol también es considerado como un elicitor general reconocido por las plantas como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) (Nürnbergger *et al.*, 2004) que induce diversos cambios en varios modelos vegetales, como por ejemplo la modificación de flujos de H⁺ (Kasparovsky *et al.*, 2003), cambios en el potencial de membrana y en la producción de ROS (Rossard *et al.*, 2006). Además, en remolacha se ha demostrado la implicación de la señalización por SA y JA en la elicitación mediada por ergosterol (Rossard *et al.*, 2010). Así, el mayor nivel de ergosterol detectado en Ta Δ Tri5 podría ser el responsable de la inducción de los genes de la ruta del SA.

Con respecto a la naturaleza de otros metabolitos que participen en la sensibilización de las plantas de tomate, la producción de al menos 5 peptaiboles diferentes, incluyendo alameticinas, trichocopactinas, trichobrevinas, trichocriptinas y trichoferina, y de 6 hidrofobinas diferentes ha sido descrita en 4 especies de *T. arundinaceum* productoras de HA (Degenkolb *et al.*, 2008), las cuales, junto con el HA y probablemente otros metabolitos desconocidos, participarían en la inducción de los genes de defensa en plantas y/o en la interacción con otros hongos fitopatógenos. Por ejemplo, recientemente se ha demostrado la implicación de las hidrofobinas de *Metarhizium brunneum* en la virulencia de este hongo frente a *Spodoptera exigua* (gusano de la remolacha) (Sevim *et al.*, 2012), lo cual apoyaría la hipótesis de la participación de este tipo de proteínas de *T. arundinaceum* en la interacción *Trichoderma-Botrytis*-planta. Adicionalmente, en una revisión reciente sobre los efectos beneficiosos que ejercen diferentes cepas de *Trichoderma* sobre las plantas, se recogieron diferentes proteínas (celulasas, poligalacturonasas, ceratoplataninas, proteínas con dominios de unión a celulosa y xilanasas) y varios metabolitos secundarios (peptaiboles, pironas, piridinas y butenólidos) que son capaces de inducir las respuestas de defensa en plantas (Hermosa *et al.*, 2012).

En conclusión, los trichotecenos son importantes para la actividad de biocontrol ejercida por *T. arundinaceum* ya que su interacción con las plantas induce en ellas la expresión de genes relacionados con respuestas defensivas. Además intervienen en la

sensibilización de la planta para responder de un modo más rápido y más potente frente al ataque de patógenos como *B. cinerea*. Y, por otro lado, su propia biosíntesis se ve alterada ya que la interacción de su cepa productora con la planta y el hongo patógeno modifica la expresión de los propios genes *tri*. De este modo, este trabajo supone el primer estudio sobre la interacción entre la producción de trichotecenos y la respuesta defensiva en plantas, mostrando el modo en el que estos procesos están interrelacionados de forma que cada uno de los organismos participantes regula a las otras partes y como los trichotecenos juegan un papel esencial en esta interacción.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. En la cepa Ta37 se han clonado 8 genes *tri* implicados en la biosíntesis del trichoteceno harzianum A, encontrándose todos ellos (excepto el *tri5*) agrupados en un *cluster*.
2. La organización de los genes *tri* de Ta37 dentro del *cluster* difiere significativamente de la descrita en los géneros *Fusarium* y *Myrothecium*, fundamentalmente por la ausencia del gen *tri5*.
3. Las actividades llevadas a cabo por las enzimas TRI4 y TRI11 son diferentes a las ejercidas por sus homólogas de *Fusarium*: la enzima TRI4 introduce 3 grupos hidroxilo mientras que en *Fusarium* hidroxila 4 veces y la enzima TRI11 es una C-4 hidroxilasa pero en *Fusarium* hidroxila en posición C-15.
4. El mayor nivel de producción de HA se alcanza a las 24h en medio PDBs mientras que el nivel de expresión de los genes *tri* estructurales es máximo a las 48h.
5. El silenciamiento del gen *tri4* no tiene prácticamente efecto sobre la producción de HA. La interrupción de dicho gen generó un mutante, Ta Δ Tri4, que produce trazas de HA pero que también sintetiza varios productos colaterales, principalmente el 12,13-epoxitrichoeno-2-ol.
6. La interrupción del gen *tri5* dio lugar a un mutante, Ta Δ Tri5, no productor de HA ni de productos derivados de la ruta de biosíntesis.
7. Como consecuencia del bloqueo de la ruta de HA, en el mutante Ta Δ Tri5 se ha alterado el patrón de expresión de los genes de síntesis de terpenos, probablemente para compensar una acumulación de FPP que es redirigido hacia la síntesis de ergosterol y farnesol.
8. La cepa Ta37 es una buena antagonista de los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*. El HA juega un papel muy importante en esta capacidad, aunque otros elementos, tales como enzimas hidrolíticas, actúan sinérgicamente junto a él.
9. La presencia de un hongo antagonista como *B. cinerea* hace que se incremente drásticamente la producción de HA por parte de Ta37, especialmente si este patógeno no es capaz de sintetizar la fitotoxina botridial.

10. La interacción entre Ta37 y *B. cinerea* hace que la expresión de los genes implicados en la síntesis de botridial de este último se induzcan ligeramente, pero dicha inducción es mucho mayor si el HA no está presente, por lo que este trichoteceno podría actuar como represor de estos genes.
11. El tratamiento con Ta37 disminuye el diámetro de las lesiones foliares causadas por *B. cinerea* en hojas de tomate, estando esta disminución en relación con la cantidad de HA presente.
12. La expresión de los genes de defensa, tanto SAR como ISR, de plantas de tomate se ve inducida por el tratamiento con Ta37, confiriendo a la planta un estado sensibilizado en el cual responderá más eficientemente a posteriores ataques de *B. cinerea*. Al igual que en la capacidad antagonista de Ta37, el HA, junto con otros elementos, interviene en la inducción de los sistemas de defensa de la planta.
13. En el ecosistema tomate-*Trichoderma*-*B. cinerea* se establecen relaciones entre los 3 componentes, en las que cada uno regula el comportamiento de los demás y en las que el HA tiene un papel principal.



ANEXOS

Anexo I: oligonucleótidos empleados en este trabajo.

- Obtención de sondas para la clonación del *cluster* de genes *tri*.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>tri4</i>	Tri4A-37	GGAAAGATGGTTGATCAAGACTGG
	Tri4A-38	GCCACTGAAGCTTACAAAAGC
<i>tri6</i>	Tri6292	GCTCTAGATGATTTACATGGCGTCCG
	Tri6293	GCCTCGAGTCAACACTTGTGTATCCG
<i>tri5</i>	Tri5F	GGCATGTGTGTTTACTCTTGG
	Tri5R	ACCATCCAGTTCTCCATCTG
<i>tri6</i>	Tri6NT	ATGGCCGCAAGAGATGCG
	Tri6CT	CTATGTCTTGCTTTCCTTT
<i>tri4</i>	Mr4BN	CACCGCCGCCACGATTGAC
	Mr4BC	GCCGGGGATAGCCTTGGGGTAG

- Amplificación de las zonas con intrones de los genes *tri*.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>tri5</i>	intri5-37	AGGCTCACGGTTGGTGGA
	outtri5-37	ATTCTTTCGCACTCTACG
<i>tri14</i>	T14int5	CACAGGTGTTACTGAGCT
	T14int3	CCAGCATAAGTGCCATTG
<i>tri12</i>	T12int5	CAACGTTATAGCGACAGG
	T12int3	AACGCAGCAGTGAAGATC
<i>tri10</i>	T10int3	GCGCCAACGTACTCATAT
	T10int5	CCATCTTAGCCTCTACGA
<i>tri3</i>	T3int3	CCTCCTCCTGACTGTAAT
	T3int5	TATTGAGGAGCTGCGAGA
<i>tri4</i>	T44int3	GTGCTGGTCAAACCTAGA
	T44inta	GTGGGTGCTCTGTATTTT
	T437CT	ACAATACGGGCGTGGGTTCAT
	T437E4bNt	GGTATTAAATCCTCGGTGCTCGTT
<i>tri11</i>	T11int3	CCCACAAGAAGTGTGTCT
	T11int5b	CGTTGCAGTACAACCTCGT

- Comprobación de la complementación del gen *tri5*.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>tri5</i>	pAN52-trpC	AGTGGAGATGTGGAGTGGG
	Tri5-839	GGAATTACTCTCGATCAGGCTC

- Amplificación de los genes *tri4*, *tri5* y *tri11* para su expresión en *S. cerevisiae* INVSc.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>tri4</i>	Tri437-5 ^{ab}	ATGTTGGACATCAACGCG
	Tri437-3b ^{ab}	TCAAAGCTTCTTGATGACCTTC
<i>tri11</i>	2105	ATGGCCAACGCTATTTTCGGTG
	2106	TCATTTACTCCGGAATCGATCATG
<i>tri5</i>	2114 ^a	ATGGTTGAGCTCAACGACGTC
	2115 ^a	CTACTGGGCGACGGAGGAGAT

^a Empleados también en la confirmación de los mutantes TaS4-9, TaΔTri4 y TaΔTri5.

^b Empleados para la expresión del gen *tri4* en *F. verticillioides*.

- Estudio de los genes *tri* mediante qPCR.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
α -actina	aactinF	ACTGGGACGACATGGAGAAG
	aactinR	GGCCTGGATGGAGACATAGA
GADPH	gpd 5F	ATGTCATCTCCAACGCCTCT
	gpd 1R	CTGGGTGGCAGTGTAGGAGT
<i>tri11</i>	11woiF	GCCCAATGAGGTTTCTTTCA
	11woiR	CGGCTCTTGTTCTGAAGAC
<i>tri5</i>	5woiF	TGTGTCGGCTCTTCAATCTG
	5woiR	GCTTATCGAGAGCCTGATCG
<i>tri4</i>	4woiF	ACTGTCGGAGCTTTCGATGT
	4woiR	GCTGAGAAGGCTCCATCAAG
<i>tri3</i>	3woiF	TTACAGTGGGGTACGGAAGC
	3woiR	CGAGGTAATCCCAATCCAGA
<i>tri10</i>	10woiF	GCCTAATCCAGATGGACCAA
	10woiR	CAATGCAGAGGTTGCGTAGA
<i>tri12</i>	12woiF	CTATGGCCTTGGGGGTTATT
	12woiR	ACAGCGGCTGAGCTAACATT
<i>tri14</i>	14woiF	ACGCCAAATCCTTTGCATAC
	14woiR	GCTCAGCATCAGCATAACCA
<i>tri6</i>	6woiF	GGTGCAAATCTACCGCTCTC
	6woiR	CGGGTTGTGTTTAGCCTCAT

- Interrupción de los genes *tri4* y *tri5*.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>tri5</i>	2100	CCTGGAAACTATGGTTCGTCT
	2101	AAAAGGCGCGCCCGCACTCTAGTATTATTGACC
<i>tri4</i>	2102	GAGAAAAATCCCCGGTCCGA
	2103	AAAAGGCGCGCCCGACCGAGGATTTAATACCAG
<i>tri5</i>	PromTri5-F	GAACATCCTTGTCGATACCG
	PromTri5-R	TAAGTGGCTCGGGGGAATT

- Amplificación de los genes *tri* de *T. brevicompactum* IBT 40841.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>tri14</i>	Tri14-F	GCAACCACAGGTGTTACTG
	Tri14-R	CATGCTACAAGAGCATCTAC
<i>tri12</i>	Tri12-F	GGGTGCTCCGGATGAAG
	Tri12-R	CTGAAACAGTAACAGCGGC
<i>tri11</i>	Tri11-F	ATGGCCAACGCTATTTTCGGTG
	Tri11-R	GCGAATCGATCATGTAATTTG
<i>tri10</i>	Tri10-F	CATCAGCAGCATTGGAGGGC
	Tri10-R	GATCCTACCCAAGCGAACGC
<i>tri3</i>	Tri3-F	GAGAAGATTAGCATATATTTAG
	Tri3-R	GTAGCAAACCTTCCGGAAC
<i>tri4</i>	Tri4-F	GCTTCTTGATGACCTTCAC
	Tri4-R	GACATCAACGCGCTGAAGG
<i>tri6</i>	Tri6-F	GAATGATGATAGCGAGACTC
	Tri6-R	CTTTCCCATGAATTCGTCG

- Análisis de los genes de virulencia de *B. cinerea* mediante qPCR.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>EF1b</i>	BcEF1b-F ^a	GCTGCCAAGTCTGTTGTCACA
	BcEF1b-R ^a	CAATGCTACCATGTCCGGTCTCA
<i>bot5</i>	BD28 ^a	CACGAACTGGACAAAGGCTAAA
	BD29 ^a	ACCACCCGCAATCAAAGC
<i>bot3</i>	BD12 ^a	CTAAGGGCTCGCGGAGTTG
	BD24 ^a	GCATTGCGCTGGCAAGA
<i>bot2</i>	BD5 ^a	CAGGTTATCCCTTTGCATGAGTAGT
	BD17 ^a	TTACACTGGTGAATGATGTTTTGTCTT
<i>bot1</i>	BD8 ^a	GGCTCCCGTGCTTGCA
	BD20 ^a	GCGAGGTGAAGAAGTTAGAGAAGGT
<i>bot4</i>	BD1 ^a	GGGAACCAGGGTCAATGTCA
	BD13 ^a	GCTTGAATTCCAGGGATCTG
<i>sod1</i>	BcSOD-F	ACATTTCAACCCACACGG
	BcSOD-R	CAGAGCCAGTAGCATTTTCCT
<i>atr1</i>	BcABC-F	CCGAAGTCACCGATTTCATT
	BcABC-R	GGCGATTTGAGCGATACA
<i>pg1</i>	BcPG1-F2	TGTCAAGAACTCTGCCAACG
	BcPG1-R2	AGTGATGGGGACACCTGAAG
<i>bmp1</i>	BcMAPK-F	CCGCAAATGTTCTACACAGAG
	BcMAPK-R	CAGAGTTATCTTCTTGGGATGC

^aTomados de Pinedo *et al.*, 2008.

- Estudio de los genes de la ruta de biosíntesis de terpenos.

Gen	Nombre	Secuencia (5´-3´)
<i>dpp1</i>	Dpp1-5 ^a	ACTCATGCGCCAGACTAT
	Dpp1-3 ^a	TGTTGTAGGCGATGAGG
	Dpp12-F ^b	CAATCCATTTTCATCGCATGT
	Dpp12-R ^b	GCCTAGGGGGATGAAGAGAG
<i>hmgR</i>	hmgR-3F ^a	TGTYGTTGTTGCTCTCTTGG
	hmgR-3R ^a	RGCAAAMGTRGARGAGAAGA
	hmgR-1F ^b	GTTGGCTTGCTCCAAGAGAC
	hmgR-1R ^b	GTCAGCCTCGTCAGAGGAAC
<i>erg1</i>	erg1-1F ^a	BTGCTACGGCTACAACGTCA
	erg1-1R ^a	GGGCRTAGAACTTGCTCTTG
	erg1-32F ^b	CGGAGGTTGTCAAGACCATT
	erg1-3R ^b	TTTGTCTCGAGGACCTGCTT
<i>erg7</i>	erg7-F ^a	GTCGACATGGAAGATGC
	erg7-R ^a	GAAATSAGGAAATCGCA
	erg7-F ^b	AGTGCTGGGACACTGCTTTT
	erg7-R ^b	ATCCCTGATCCTTGTGCTG
<i>erg9</i>	erg9-atr 2F ^a	GCCTCGACACAATTGAGGAT
	erg9-atr 2R ^a	CTTCAGCGCATCAAGTACCA
	Ta37 erg9-5F ^b	GCATGGCTGACTATGCTGAA
	Ta37 erg9-5R ^b	AGAACTGACCCATGGACTCG

^a Empleados para clonar fragmentos internos de los genes de Ta37.

^b Empleados en el análisis mediante qPCR.

- Análisis de los genes de defensa de tomate mediante qPCR (tomados de Tucci *et al.*, 2011).

Gen	Nombre	Secuencia (5´-3´)
α -actina	Actin-F	CACCACTGCTGAACGGGAA
	Actin-R	GGAGCTGCTCCTGGCAGTTT
PR1b1	PR1b1-F	GCACTAAACCTAAAGAAAAATGGG
	PR1b1-R	AAGTTGGCATCCCAAGACATA
PR-P2	PRP2-F	GGAACAGGAACACAAGAAAACAGTGA
	PRP2-R	CCCAATCCATTAGTGTCCAATCG
PINI	PINI-F	TGAAACTCTCATGGCACGAAAAG
	PINI-R	GGCCACATTTGTTTTTCCTTCG
PINII	PINII-F	GGCCAAATGCTTGCACCTTT
	PINII-R	CGTGGTACATCCGGTGGGATA
TomLoxA	TomLoxA-F	TGAACCATGGTGGGCTGAAA
	TomLoxA-R	CTGCCCCGAAATTGACTGCTG

ANEXO 2: secuencias nucleotídicas y proteicas obtenidas en este trabajo.

Tri5 (Accession number: FR715494)

ATG GTT GAG CTC AAC GAC GTC CCT GGT GAG GAG GAA TTC CCC CGA GCC ACT TAC CTG GAA 60
 M V E L N D V P G E E E F P R A T Y L E
 ACT ATG GTT CGT CTG TTG GAT ACC GTT AGC TAC AAC GAC GAG AAC TTC ACA GAC GAG GAG 120
 T M V R L L D T V S Y N D E N F T D E E
 CGT GTT GAG TGC TTG AAG TAC GCT TAC GGA AAG GCT GCC GAG CAT TTT GCT CAG CCT CAT 180
 R V E C L K Y A Y G K A A E H F A Q P H
 GTC CAG GAG ACT TTG AAA GTG CCT CCT AAG CGA ATG GCT GCT GCT CTC AAG ACC ATT GTC 240
 V Q E T L K V P P K R M A A A L K T I V
 GGC ATG TGT GTT TAC TCT TGG TGC CGC GTG TCC AAG GAG GTC ATG GCA GAT CTC AGT ATC 300
 G M C V Y S W C R V S K E V M A D L S I
 CAC TAC ACG TAC ACC CTG CTT CTT GAC GAC AGC AGA GAA GAG CCT GCT GGT ACC ATG GCA 360
 H Y T Y T L L L D D S R E E P A G T M A
 ACT TGG TAC GAG GAT CTT CTA AAT GCC AGG CCA CAG GCT CAC GGT TGG TGG AGA CTG GTC 420
 T W Y E D L L N A R P Q A H G W W R L V
 AAT GAC TTC ATT CCC AAT GTC CTT CGT CAC TAC GGA GGC TAC TGC CAG ATG AAC ATG GTT 480
 N D F I P N V L R H Y G G Y C Q M N M V
 CGC AGC ACC ATT GAT T gtaagttttccgcctatctgtccatttttggacgaaactgctaacacgccaatttag 555
 R S T I D F
 TT TTC CAA GGC TGC TGG ATT GAG CAG CAC AAC TTC AAG GGC TTC CGT GGC TCC AGT GAC 614
 F Q G C W I E Q H N F K G F R G S S D
 TAC CCT GGC TTC CTC CGC CGT ATC AAC GGC CTG GGC CAT TGT GTC GGC TCT TCA ATC TGG 674
 Y P G F L R R I N G L G H C V G S S I W
 CCT ATT GAA CTT GTG GAT GAG GAA GAG CAC TTC CTC GAA ATT ACC ACA GCA ATC GCC CAG 734
 P I E L V D E E E H F L E I T T A I A Q
 ATG GAG AAC TGG ATG GTC TGG ACT AAT GAC CTA TTC TCC TTC TAC AAG GAA TAC TTT GCT 794
 M E N W M V W T N D L F S F Y K E Y F A
 GAG CGT GAT CAG ACC TCT CTG GTC AAT AAC TAC GTA GAG TGC GAA GGA ATT ACT CTC GAT 854
 E R D Q T S L V N N Y V E C E G I T L D
 CAG GCT CTC GAT AAG CTC TGC AAA GAT ACT ATT CGA AGC TCG GAA GAG ATT ATC CAG GTC 914
 Q A L D K L C K D T I R S S E E I I Q V
 TTC CAC GAC AAA GAT CCC AAG ATG TAT GAG ATC CTG ACT CGT TTC ATC CAA GGC TAC ATC 974
 F H D K D P K M Y E I L T R F I Q G Y I
 ACT TGG CAT TTG TGC GAT GAC CGG TAC CGC CTA GTC GAG GTC TAC GAA GCC GCT GGA GAC 1034
 T W H L C D D R Y R L V E V Y E A A G D
 GAC CCC GTT GCT CAA AAG TTC AAG AAG TAT GCC GAG TCT GCT CGT CGT GTT GGC GCC ATA 1094
 D P V A Q K F K K Y A E S A R R V G A I
 GAC CCT GCT AGA TAC TGC GTA CCC TCG GTT ACC GAG CTA TGC GAG CGT GAG ATG GCT AAG 1154
 D P A R Y C V P S V T E L C E R E M A K
 CAG TCC GCC GGT CGC AGC TGG GAT TTC GGC CTC GGC AAG ATA GCC AAC AAG ATC TCC TCC 1214
 Q S A G R S W D F G L G K I A N K I S S
 GTC GCC CAG TAG 1226
 V A Q .

Tri4 (Acc. No. FN394491)

ATG TTG GAC ATC AAC GCG CTG AAG GAG ATC CCG CCA GCG ACT GCC GTC GGA GCA GCA GTG 60
 M L D I N A L K E I P P A T A V G A A V

GCG GTG GGT GCT CTG TAT TTC TTT TGT CAA TGC TTC TAT AAT CTT TAC TTG CAT CCA TTG 120
 A V G A L Y F F C Q C F Y N L Y L H P L

AGA AAA ATC CCC GGT CCG AAG TTG GCA GCC ATT GGC CCT TAT CTG GAA TTT TAT CAT GAA 180
 R K I P G P K L A A I G P Y L E F Y H E

GTG CTA AGA GAT GGT CAA TAT CTC TGG GAG ATT GAA AAG ATG CAT CAA AAA TAT G gtacgg 241
 V L R D G Q Y L W E I E K M H Q K Y G

accggagtgtttctcatcttagataaatcaactgaagctctggatag GC CCA ATC GTT CGT GTT AAT GCC 311
 P I V R V N A

AGA GAG GTG CAC GTA AAA GAT ACA TCC TAT TAC AAC ACA ATT TAT ACC GCT GGA GCT CGA 371
 R E V H V K D T S Y Y N T I Y T A G A R

AAA ACC AAC AAA GAT CCT GCT ACT GTC GGA GCT TTC GAT GTT CCA ACT GCC ACT GCT GCG 431
 K T N K D P A T V G A F D V P T A T A A

ACG GTC GAC CAC GAC CTC CAC CGT GCT CGA CGC GGT TAT CTA AAC CCT TAT TTC TCA AAG 491
 T V D H D L H R A R R G Y L N P Y F S K

CGT GCG GTT GCA GGT TTG GAA CCA ACT ATC CAT GAA CGG ATT ACC AAA TTG CTC TCT AGG 551
 R A V A G L E P T I H E R I T K L L S R

TTT GAC CAG CAC CGG AAG GAC GAT CAA GTG CTT TCT CTT GAT GGA GCC TTC TCA GCT TTA 611
 F D Q H R K D D Q V L S L D G A F S A L

ACT GCA GAT GTT ATA ACC GCC CGC TTT TAT GGA GAA CAT AAG GAC TAT CTT GAT GTC CCG 671
 T A D V I T A R F Y G E H K D Y L D V P

GAC TTC CAT TTT GTT GTC AGA GAT GGA TTC CAG GGT CTT TCA AGG GTC TAC CAT TTG GGT 731
 D F H F V V R D G F Q G L S R V Y H L G

CGC TTT TTA CCT TCT GTC GTA GGG GCA CTG AAG GGT CTG CCA AAA TTT CTC ATT CGT ATT 791
 R F L P S V V G A L K G L P K F L I R I

ATC TTT CCA CCT ATT GCT GAA CTT CTG ACT ATG CGA GAA GAA ATC GAG GCT GGT GGT ATC 851
 I F P P I A E L L T M R E E I E A G G I

GAT GAA TTT ACT AAA AGC AAA TCA TCT GGT ATT AAA TCC TCG GTG CTC GTT GGC GCA CTC 911
 D E F T K S K S S G I K S S V L V G A L

TCG GAT CCG CAT ATT CCC CCC CAA GAA CGA ACT GTT GCT CGG ATG CTG GAT GAG GGC ACC 971
 S D P H I P P Q E R T V A R M L D E G T

GTC TTC CTA TTC GCC GGA ACC GAG ACA ACA TCA CGA ACT CTT GGT ATC ACC ATG TTT TAT 1031
 V F L F A G T E T T S R T L G I T M F Y

CTT TTA AGC AAC CCG GAT ATT TTG AAT AAA CTT CGT GAG GAG TTG AAA TCT TTG CCA CCC 1091
 L L S N P D I L N K L R E E L K S L P P

AGC GAC GAC AAC ATG CAC TCT CTA GGA CAA CTC GAA AAT CTC CCT TAC TTG gtaaatctgaa 1153
 S D D N M H S L G Q L E N L P Y L

caaaaatttcgattaataaaaagcctatctaacaagatgcctctag ACT GGT GTT GTC CAT GAA GGA CTT 1222
 T G V V H E G L

CGA CTT TCC TTC GGC CCC ATT AGT CGC TCA TCC AGA GTA GCT ACT CAT GAA GCG TTG CAG 1282
 R L S F G P I S R S S R V A T H E A L Q

TAC AAG GAG CAT ACC ATT CCT GCA GGT gtaaggataactttgttcggttttctccatctggtgagatatac 1352
 Y K E H T I P A G

tgacaactattctag ACT CCT GTT AGC CAG TCG ACA TAT TTC GTG CAT ACC GAT ACA GAA ATA 1415
 T P V S Q S T Y F V H T D T E I

TTC CCA GAC CCT TGG GAA TTT AAG CCT GAG CGA TGG ATT AAA GCG GCT GAG GAT GGT GTT 1475
 F P D P W E F K P E R W I K A A E D G V

GCG CTT AAG AAG TAT ATT ACC AAC TTT TCT CAG GGA AGC AGG CAG TGC ATC GGC TAC AG g 1535
 A L K K Y I T N F S Q G S R Q C I G Y S

taagcctctcctttcattcggaagagatcattcatatgtgtgatgtttgaaactaacatgatttatag C ATG TCA 1611
 M S

TTT GCG GAA ATG TTC TTG ACT CTT TCT AGA ATT ATT CCA GCG TTT GAC CTT GAG CTG TAC 1671
 F A E M F L T L S R I I P A F D L E L Y

GAT ACT ACG AAA GCT GAC ATT GAC ATG ACC CAC GCC CGT ATT GTC GGA TAT CCC AAG AAG 1731
 D T T K A D I D M T H A R I V G Y P K K

GTT CCA GGC AAG ACT GAA TCA CTT GGA GAG CTC AGA GTG AAG GTC ATC AAG AAG CTT TGA 1791
 V P G K T E S L G E L R V K V I K K L .

Tri11 (Acc. No. FN394493)

<u>ATG</u> GCC AAC GCT ATT TCG GTG GGC GTT GCA GTA CAA CTC GTC TTA ACA GTC TTG TTG GCA M A N A I S V G V A V Q L V L T V L L A	60
TCA ATA CCT CTC AGA GTC ATA TGG AAC CTC TTT TTC CAC CCA TTG AGC TAC ATT CCG GGG S I P L R V I W N L F F H P L S Y I P G	120
CCA AGG TTA TGG ATT GCG TTT CCC ATT TTC AGG CAG ATT GCC TCG ATC CGA GGA GTC TTT P R L W I A F P I F R Q I A S I R G V F	180
GAT GCG CAG ATG TGC GAG TAT CAT CGC AAG TAT GGC AAT GCA GTT CGA TTT TCG CCC AAT D A Q M C E Y H R K Y G N A V R F S P N	240
GAG GTT TCT TTC ATC ACG GAG CAG GCC TGG AGA GAT ATC TAT GAC CAT CGT CCC AAC CAG E V S F I T E Q A W R D I Y D H R P N Q	300
CTA GAA CGA TTT ATT CTC TCA ACA ACA CGC CGA CCG GAT ATT TTT GAT GCC AAT GAG ATC L E R F I L S T T R R P D I F D A N E I	360
GAC CAT GCT CGT TAC CGC AAA GCC ATG CTA CCC GCA TTC TCT CCA AAA GGT CTT CAG GAA D H A R Y R K A M L P A F S P K G L Q E	420
CAA GAG CCG ATT GTA AGA GGC TAT ATC GAT ACT TTT ATT GAG AGG CTC AGA GAA GTG TCT Q E P I V R G Y I D T F I E R L R E V S	480
GCC ACT GGG GAA TCG ACG GAC ATG GTT AAA TGG TAT AAT TTT ACC ACT TTC GAC ATC ATT A T G E S T D M V K W Y N F T T F D I I	540
GGT GAT CTT GCA TTT GGT GAA TCC TTT GGA GGG CTC CGC AAT CGC GAA TAC CAC TTC ACC G D L A F G E S F G G L R N R E Y H F T	600
ATC TCA TTC ACA TTC GAA GCT TTC AAA CTT CTT TCA TAT CTG GAA GCT GGT GCT GCA TAC I S F T F E A F K L L S Y L E A G A A Y	660
CCA CTG CTG TTG AAG ATT CTC ATG GCT TTT ACG CCT CAG AGT CTA ATA GAA GCT CGA GAT P L L L K I L M A F T P Q S L I E A R D	720
AAG AAG GAA GAA CAT GCA GAG ACC ACT GTC CGG AAG CGA CTA GAT AAT CGC GCC TTG CAT K K E E H A E T T V R K R L D N R A L H	780
GGC CGC GGT GAT TTT ATG GAT TAT TTA TTA CGA AAT CGT GGC GAG AAG CAG GGT CTT AAT G R G D F M D Y L L R N R G E K Q G L N	840
GAC AAA GAG CTT GTG GCA AAC GCG AGT ACG CTT ATT ACC GCA GGA AGT GAG ACC ACA GCT D K E L V A N A S T L I T A G S E T T A	900
ACA ATC CTT TCG GGT ATC ACC TAC TGG TTG TTG CAA ACC CCG AAT GTG CTT CAG AAA GTG T I L S G I T Y W L L Q T P N V L Q K V	960
ACT GAA GAA GTG CGC TCT GCA TTC CAA TCA GAG GCT GAT ATT ACC TTT ACT TCT GCC ACT T E E V R S A F Q S E A D I T F T S A T	1020
TCT CAG CTG CCT TAT ATG CTC GCT TGC TTC CAG GAA GCA TTC AGA CAT TAT CCT CCA GTT S Q L P Y M L A C F Q E A F R H Y P P V	1080
CCA ACT GGT ATG CCA CGG GTC ACC CCA TCT CAC GGA ATA ACG AAG ATT TCG GGA TAT GAT P T G M P R V T P S H G I T K I S G Y D	1140
ATC TCT CCA AAT <u>gtaagtgcaacgacaaaagctgaaaccttggtgtaactataggaagaaatgctaacatagtt</u> I S P N	1215
<u>ttgaatcttgctcatag</u> ACC AAA GTC TCT GTC CAC CAA TTA GCC GCG TAT TCC CAT CCT GAC AAC T K V S V H Q L A A Y S H P D N	1280
TTC CAT CGA CCA CGG GAA TTT GTT CCT GAA AGA TGG CTT CCC GAC GCA AAA ACT AAC CCC F H R P R E F V P E R W L P D A K T N P	1340
TCT TCG CCA TGG TAT AAT GAT CGT CGT GAA ACA GTG CAA CCT TTC AAC GTC GGA CCG CGC S S P W Y N D R R E T V Q P F N V G P R	1400
AAT TGT GTT GGT CGA AAT CTT GCT GAA CAA GAA ATA CGT GTC ATG CTG GCT CGG GTT CTG N C V G R N L A E Q E I R V M L A R V L	1460
TGG AAT TTT GAT TTG GAA CTG GCC CCA GAG AGT AAA AAC TGG ACC GAC CAA AAG ACA CAC W N F D L E L A P E S K N W T D Q K T H	1520
TTC TTG TGG GAG AAG GGA GCC TTG ATG TGC AAA TTA CAT GAT CGA TTC GCC AGT AAA <u>TGA</u> F L W E K G A L M C K L H D R F A S K .	1580

Tri3 (Acc. No. FN394495)

ATG GGT AGC AAA CTT CCG GAA CTT CCT AAA TTA AGC CCA GAA AAG CAT CGC TGG GAG AAA M G S K L P E L P K L S P E K H R W E K	60
TCA AAT GTG GAT CCA CGT GTG CTG CAA CGC CGA GGC ATA GGT TCA GAG GCT ATC GTG GGA S N V D P R V L Q R R G I G S E A I V G	120
ATG GAG AGG AGC AAC CGA AGA GGG CAA TAT GAT CTG TAT CTA CTC GCC ACG CTT CGC ACG M E R S N R R G Q Y D L Y L L A T L R T	180
GCT CAT GTG TCG ACT TCA ACC CCT CTA TCG CTA TTA TAC TTG AAA GAG AAA CTG GAG CTA A H V S T S T P L S L L Y L K E K L E L	240
GCT TTA TTG GTG ATG AGA TTT GAG CAC CCA GAA TGT GCC TGT ACG GTA ACG TGG GAT GAC A L L V M R F E H P E C A C T V T W D D	300
CAA GTT CCT CCA ATT ATA CAA TAC GCA TCC CCT CAG AAT GAT GAA GAG GCT CTT ATG TGG Q V P P I I Q Y A S P Q N D E E A L M W	360
GCT AAA AGC TCC GTT CAT ATC CGT ACT ACC TCA CAA ACA GGT TTC GAT GTT CGA TAT GAG A K S S V H I R T T S Q T G F D V R Y E	420
ATA GAG GGC AAG CGC CAA GAT CTT GAC CAG GAT AAC ATG GAA CCT TCA CGC CCA ATT GTG I E G K R Q D L D Q D N M E P S R P I V	480
ATA TAT CTG ATT TCA AAC GTC ACT AAT GGG GAT GCA CAG CTC ACT AGT GGA GCT ACG GTT I Y L I S N V T N G D A Q L T S G A T V	540
GAT GTG TTA TTA CAC ATG AAC CAT CTC TTT TGG GAT GGA ATC AGC GCA CGC ATG TTC ACA D V L L H M N H L F W D G I S A R M F T	600
GGC GAT CTT TTT CGA GAA TTG AAT AAA CTC ATC AAC TCT AAT GAG CAG GAA CTA CCG AAA G D L F R E L N K L I N S N E Q E L P K	660
TTA CAG TGG GGT ACG GAA GCA TCA AAC CTC AGT GCT CCC GTG TTA GAT GCT CTG AAA ATT L Q W G T E A S N L S A P V L D A L K I	720
AAT ATT GAG GAG CTG CGA GAG GAG TTT GAA GCC GCA AGC AAC CAA TTT GTT AAG GCA TTG N I E E L R E E F E A A S N Q F V K A L	780
TAT GAG AAC TAT GTA A <u>gtatctcactagcattgatctatttgggctaacaacattgtccgtaagggag</u> Y E N Y V S	849
GT TGG GGC CTG GAG TTC AAA TCT GGA TTG GGA TTA CCT CGT ACT GAC ATA CAC ACC TCT W G L E F K S G L G L P R T D I H T S	909
ACT GCC ACC GAG AGC AAA GCG ATT ATT AAC GGT GTT AAA ACT CGT CTG GGT CCT CAG TAT T A T E S K A I I N G V K T R L G P Q Y	969
ACA ATC TCT CAT CTG GCT CAG GCT GCC GTT GTG ATC GCG ATG TTG GAA ATC ATT CAG CCA T I S H L A Q A A V V I A M L E I I Q P	1029
CCT AAC CTA ACC GAT AAA GAC ATT TTC GTT TCC CCA ATG CCT GTA AAT GGC CGA CGG TGG P N L T D K D I F V S P M P V N G R R W	1089
TTG AAG GAT GGA TTG GCA GAC CAT CAC TAC AGC ATA TGT GAG ACC GGA GCC GTG ATC AGG L K D G L A D H H Y S I C E T G A V I R	1149
ATC GAG AAT ATT AAA TCC CTT GTT CTG AAC AAC AAT AAT GAT AAG GGA TAC CGT CCT CGG I E N I K S L V L N N N N D K G Y R P R	1209
TGC GAT GAA AAA AAG CCT GGT GAA GAT GTC AAA AAG TCA TTT GAT CAA TGG CTG GGT AAC C D E K K P G E D V K K S F D Q W L G N	1269
CCG TAT CAA TTA GCA CTT GGT CTT GCG GTT CAC ACT CTG GAG GCA TCG TTT TTG ACT GC P Y Q L A L G L A V H T L E A S F L T A	1329
<u>gtatgataagatggcggaactcatcaaccagaacaagctaacaagagttaatccag</u> G AAT CCA ATG CCA TTC N P M P F	1400
GAC AAA GTC GCT GCA CCG <u>gtatgttctcgcgcttttggattattaaaccaaacctaacataatgcgca</u> D K V A A P	1470
<u>aag</u> TTT TTT ATA AGC GAC GGG AGA AAC GAA CAA TTC ATT CCT GCG AGC ATC ACC ACT ACG F F I S D G R N E Q F I P A S I T T T	1530
ACG GGC GAA ATC CTT ATG ACG ATT GAT AAT TTT GTT TTT TTC TTG AAT CAG TGC TTG CCG T G E I L M T I D N F V F L N Q C L P	1590
TAT TT <u>gtaaggcttgagccctcccattcgtccacctattgattaatccttacaatgcttcag</u> G GCC ATC CGA Y L A I R	1662
CTC GAG AGC TGG AAA GAT GCT TCC ACT TTA TCT GTC TGC TAC AAC AAA GCG AAT TAC AGT L E S W K D A S T L S V C Y N K A N Y S	1722

CAG GAG GAG GCA ACC AAG TTT CTC AAA TGT GTG GCT AAA TAT ATG CTA ATC TTC TCC CAA 1782
 Q E E A T K F L K C V A K Y M L I F S Q

TAA 1785
 .

Tri6 (Acc. No. FN394497)

ATG AAT GAT GAT AGC GAG ACT CCT GGT GCA GAG GCC TGG ATG GCC TTG CCT CTG TTT AAC 60
 M N D D S E T P G A E A W M A L P L F N

CGG AAA GCC TCG CCA GAC CAC GAA CAA AAC GTG CTG ACG TGG TTC GAG TGC TGG CGG CCA 120
 R K A S P D H E Q N V L T W F E C W R P

CCG GAA GAT GAT GTC TCG GAT TTT AAA AGC CTG GAA GAC TAT GAA GAT TCG CCG ACC CAT 180
 P E D D V S D F K S L E D Y E D S P T H

TCC ATA GGG TCT TCG GGG CTT CAT TCG GGG TCA CTA GAC TCG GAC TAC CAC TAT TAC ACT 240
 S I G S S G L H S G S L D S D Y H Y Y T

GCA TCC GAC CTT GTT TTT TCC GAC GAT GGT GGA GTA GGC AGG AAC GCA GAC CTG CTA TCC 300
 A S D L V F S D D G G V G R N A D L L S

GAA ATC TCG GAC GAC CAT ATT CCA CAA CTT TCA TTT TCT ACA CCT AGC ACG TGC CCG TTT 360
 E I S D D H I P Q L S F S T P S T C P F

CCC GGG TGC AAA TCT ACC GCT CTC TTC ACC ACT GGA AGA GAC TTT CGA CGC CAT TAT CGC 420
 P G C K S T A L F T T G R D F R R H Y R

CAG CAC TTT AAA CGT TTT TTT TGT CGT TAC GAG GAA TGC TCT CAA TCT ACA AAT GAT CCA 480
 Q H F K R F F C R Y E E C S Q S T N D P

GGT GAC GCT GGT AAA AAG GGT TTT GCA ACT CGT AAG GAT CGT GCG CGC CAT GAG GCT AAA 540
 G D A G K K G F A T R K D R A R H E A K

CAC AAC CCG GCC ATC AGA TGT CAA TGG CGG GAC AAC AAC GGA GAC CAA TGT ACG AGA ACA 600
 H N P A I R C Q W R D N N G D Q C T R T

TTT AGT CGC ATG GAT AAT ATG AGG GAC CAC TTT CGA CGA ATT CAT GGG AAA GAA TAA 657
 F S R M D N M R D H F R R I H G K E .

Tri10 (Acc. No. FN394494)

ATG ATC CTA CCC AAG CGA ACG CAG GAG AAA GAG ATT AGT TTA CTG ATG CAC TAT CTG GAC 60
 M I L P K R T Q E K E I S L L M H Y L D

GAG GTC TTC CCT CTC CAA TTC CCG TTC CAC GAA CGG AGA TAT GTA GGA AAA AGA GAA TGG 120
 E V F P L Q F P F H E R R Y V G K R E W

CTG TTA ACC ATC TTA GCC TCT ACG AGG CCG GTG TAT TAT GCA ACA CTG AGT CTC AGC TTA 180
 L L T I L A S T R P V Y Y A T L S L S L

CTT CAC AAG GAA GCC TGT CTA CAC GAG TTT GAA GCC GAA TTA GCA GAA ATA TGG CAG AAG 240
 L H K E A C L H E F E A E L A E I W Q K

GAA AAG ATG CGG TAC TAT ATA CTG GCC CTC CAG GAG TCA CAA CAG CAG TTG GAT GCG CTA 300
 E K M R Y Y I L A L Q E S Q Q Q L D A L

GAC ACA GCC TAT GGC ATA GCA AAG ATG AAG GGA AAC ATC CAT GCT TTA GCG AGC ACT CTT 360
 D T A Y G I A K M K G N I H A L A S T L

CAG CTC ATA AGT TTC GAG gtagctatgatcttggccaagttggagcaccttttgactttttgactaacgga 433
 Q L I S F E

aaaattcccattccag TCC TCA AGT CTC AGC AAG GGC GAC TGG CAG CTC CAC CTT CGG GCG GGG 496
 S S S L S K G D W Q L H L R A G

ACC TCA CTG ATC CCA GTC TTG ATT GAT GGT TGG GCC GTG GCG CTC AAA TCA GAC AAA GTC 556
 T S L I P V L I D G W A V A L K S D K V

GCA TCC TCT TCT TCT CTT TGG ACC GAA TTA GAT GCG TCG GAT TTC AAT GCA ACG CAT GAC 616
 A S S S S L W T E L D A S D F N A T H D

GAA GAC TCG CTC TCA TAT GAG TAC GTT GGC GCT CTA AAA TTC TTT GCA AAC GTC TTA GCC 676
 E D S L S Y E Y V G A L K F F A N V L A

ATG TTT GGC ATA TTC TCC TGC ATT TCC ATT GGC CCA TCT TCA CCA TTC ATG GAA TAT CGA 736
 M F G I F S C I S I G P S S P F M E Y R

TTC CTA ATG GAT CAG GCA GGC CTA ATC CAG ATG GAC CAA ATA ATG GGA TGC AGG AAC TGG 796
 F L M D Q A G L I Q M D Q I M G C R N W

GCA ATG CTG GCC ATT TTG GAG ATA GGG ACA TTG GAT AAG TGG AAA CGA GAA GAG CAA GAA 856
 A M L A I L E I G T L D K W K R E E Q E

AAC CGA CGG TTA AGC CTC AAA GCT CTG ACA AGC AGA GCG ATG GCA ATA GAA GGC GTA TTG 916
 N R R L S L K A L T S R A M A I E G V L

GAA AGC GGG CTT CGA GAA GCC TCG GGC AGC GCG CTA GTA GAT CTT ATC ACT AGT ATC TAC 976
 E S G L R E A S G S A L V D L I T S I Y

GCA ACC TCT GCA TTG ACA TAC CTA CAT ACA GTA GTG TCT GGC CTT AAT CCT AAC CTT TCC 1036
 A T S A L T Y L H T V V S G L N P N L S

GAA GTT CAA GAG AGC GTG GCT GCA ACC ATA GTA TTG CTA AAG CGA CTG CCG GAT CTG CGT 1096
 E V Q E S V A A T I V L L K R L P D L R

GCT GCC AAA AGC CTC GTC TGG CCT TTA GGC GTT ACG GGT TGC ATG GCA TCA CGG AGC CAA 1156
 A A K S L V W P L G V T G C M A S R S Q

GAG GAT TTT TTT AGA GGC CTC ATC ATT TCA GCA GGC GCC ACT CCA CGA GCA TTA AGA AAT 1216
 E D F F R G L I I S A G A T P R A L R N

TGT TGG GGC CTA ATG AAG GTT TGG GAG GAC ACT TGG AAA ATG AGA GAA TAT ATG AGC AAA 1276
 C W G L M K V W E D T W K M R E Y M S K

CAG CCA CCT GAA CGA TGG GAA GAG GTG GTC AGC GGT CAA GGC CCT CCA ATG CTG CTG ATG 1336
 Q P P E R W E E V V S G Q G P P M L L M

TAG 1339
 .

Tri12 (Acc. No. FN394492)

ATG GGT GCT CCG GAT GAA GTG CTG AAT ATA GCC CCC GAT GAA GGG GAC AAA CTC CGT GCT 60
 M G A P D E V L N I A P D E G D K L R A

AAA GCC CTT GCA GCA GAT GCG GAA GAA CTA CCA GCT GGT TAC TAC ACG AGC CCT CGC GTG 120
 K A L A A D A E E L P A G Y Y T S P R V

GTG TGT ACA TTT ATG TCG ATA TCT CTC ACT CTG TTG AGC ACA TAC TTC GCT TTT GAA GCT 180
 V C T F M S I S L T L L S T Y F A F E A

TCA GCC GCC GCC ATT TCA TTC ATA ATC GAA GAC ATT GGG CCC AGC GAA AAT GTC AGT TTG 240
 S A A A I S F I I E D I G P S E N V S L

TTC TCA ACC GTG TGG ACA GTC AGC CAG TCT ATC AGT ATC TTG TTG ATG GGA AGG CTC ACA 300
 F S T V W T V S Q S I S I L L M G R L T

GAT AGA TTT GGT CGT CGG GGG TTC ATC CTT GGA ACG AAC TGT GTT GGA ATT ATC GGT GGT 360
 D R F G R R G F I L G T N C V G I I G G

ATT GGT TGC TTG TAC AGC TTT CAA AGG TTT AAT ACC ATG ATT GGA GCA CAG GTA TTG CTG 420
 I G C L Y S F Q R F N T M I G A Q V L L

GGT CTC GCC GCT GGG CAG CCA GGA GCG TGT ATT CTC TTC ATT GGC GAA CTC ATG AGC AAC 480
 G L A A G Q P G A C I L F I G E L M S N

AAG ACC AAG TTC TTG GGA AAT GTT ATT GTT GCA TTT CCC AAC GTT ATA GCG ACA GGA TTT 540
 K T K F L G N V I V A F P N V I A T G F

GGC CCG TAC ATT GGC CAG AGT CTC GGT ATT AAT GGT AAC TGG CGA TGG ATC TTT TAT ATA 600
 G P Y I G Q S L G I N G N W R W I F Y I

TAT ATC ATC ATT ACA G gtattgtcttgcatattattgatcactcgtggaaaatgcgctaacttaagtaaaag CT 673
 Y I I I T A

GTT TCA ACA GTA CTC GCT TTC ATC TTC TAC CAT CCT CCC TCC TTT GCC CAG CTT CAC GGA 733
 V S T V L A F I F Y H P P S F A Q L H G

AAG AAG ATA AGT AGG CGA GAC GAA CTC TTG AAG GTG GAT TGG ATC GGC GCA TTC TTT CTC 793
 K K I S R R D E L L K V D W I G A F F L

ACA GCT GGA ATG ACT CTC TTT CTT TTA GGA GTC TCA TGG GGA GGC TCA CCC GAT CCA TGG	853
T A G M T L F L L G V S W G G S P D P W	
GAC TCT CCT AAG ATT CTT GGC CTG TTA ATA TCT GGA ATC GTG AGC TGC GTT ATA TTC GTG	913
D S P K I L G L L I S G I V S C V I F V	
TTG TAC GAA TGT TAT GCC AAA ATC GAT CGC CCA ATA ATT CCA ATG GAG TTT TTT CCG GGG	973
L Y E C Y A K I D R P I I P M E F F P G	
ACG TTC GCG GGT TTT GGC TGT ATG CTA TTA ATT AGT GGT GTC ATG GGA AGC ATG AAC ACG	1033
T F A G F G C M L L I S G V M G S M N T	
GCT CTA TTT ATC ATG TAT CCC CAA CAG GTG CAA CAT ATT TTC AGC TCA ACT TTG AGT AGC	1093
A L F I M Y P Q Q V Q H I F S S T L S S	
TGG CAA GAG GTT GCC TGG ATG TCT TCG ACA GCG GGT TTT GGA ATT TGG GCT GGT ATC GTT	1153
W Q E V A W M S S T A G F G I W A G I V	
ACT CTG GGA AGC TTG TTC CAT ATC TTC CGC CAT ATT CGC TGG CAG CTG ATC TTC GGC AGC	1213
T L G S L F H I F R H I R W Q L I F G S	
GCG TGG GTA ACG GCT TTT CTA GGT GCA ATG GCT TCT GTC AAT CGC CAC AAA AAG TCG GAA	1273
A W V T A F L G A M A S V N R H K K S E	
GCA ATT GCT TTC TCA ATA TGC ACG GGT TTC GTT ATT GGC TGG GCG GAA GAT GTT ACT ATG	1333
A I A F S I C T G F V I G W A E D V T M	
CTT CTA GTC CAA TTC ATT TCT TCT GAT GAA AAC CTG GGT GTT ACG TTC T <u>gtatgtgcttct</u>	1394
L L V Q F I S S D E N L G V T F S	
<u>catgaagatccttcaagcaagttgcctaatactcttaacatttgacttattctag</u> CC GTT GTT TCT GCT ACA	1467
V V S A T	
AGG GCT ATT TGC GGA TCG ATC TTC ACT GCT GCG TTT ATT TCA CTC TAC ACA ATC AAG TTT	1527
R A I C G S I F T A A F I S L Y T I K F	
CCT GGA CAA CTG CAG TCA AAG TTA GTG CCA GCC GTG CCG CGA CGC TGG GGC TTC CCC GGA	1587
P G Q L Q S K L V P A V P R R W G F P G	
GTC CTT CTG GTT GCT GGA TTT GCT TAC TGG CGG GCA CTG ACG GGG CAA TGC CCA AGC TAT	1647
V L L V A G F A Y W R A L T G Q C P S Y	
TGG CTG CTG TTC CCT GGT ATG ACA TCA AAC CTT ATC CAA GTA ACA AAT GAT GCT GTA GCA	1707
W L L F P G M T S N L I Q V T N D A V A	
GAC AGT TAC GCT GCA GCA TAC TCC TAC GTT TAT TAC TTC GCT ATG GCC TTG GGG GTT ATT	1767
D S Y A A A Y S Y V Y Y F A M A L G V I	
GCT ATC ATC GCA TCT GCC TGC ACC AAA GAT TTC GAC CAC TAC CTT ACC AGT CAC GTG CCA	1827
A I I A S A C T K D F D H Y L T S H V P	
CAT CAG ATT TAT GCT GCA AAG GAT GCT GAT GTA GAC TTA TTG GAT TCC GAT CGC TCT ACC	1887
H Q I Y A A K D A D V D L L D S D R S T	
GAG AAT GTT AGC TCA GCC GCT GTT ACT GTT TCA GAA AAG GAA <u>TAA</u>	1932
E N V S S A A V T V S E K E .	

Tri14 (Acc. No. FN394491)

<u>ATG</u> CAA CCA CAG GTG TTA CTG AGC TCA CTG CTC CCC TTA AGC GAC TAC ATT TCA GGA TGG	60
M Q P Q V L L S S L L P L S D Y I S G W	
TCT TGG GGC AGC CTG TTG GGA AAT CAA CCA TGT CCA CCT CTG CCG GCA GGT GAT CTT GTC	120
S W G S L L G N Q P C P P L P A G D L V	
ATG CCG AAA TAC CAG ATG TAT CCT GAG AAC TTC ATG TGG GAC AAA AAA CGC TGT GTT GCC	180
M R K Y Q M Y P E N F M W D K K R C V A	
TAT GTC AG <u>gtatgccccgatgtctcctgagcaactgagatctcttctaatttgcataccaatattctag</u> C AAT CTC	254
Y V S N L	
TAT AAT GCT ACG CTC AGT ATC TAT GAT CCT TAT AAG TCC GAA GTC ATC GAC ACG ATT TCG	314
Y N A T L S I Y D P Y K S E V I D T I S	
TTC CCA GGT TTA AGC CAC CCA GGG GAC TCT GCT ACG CCA AAT CCT TTG CAT ACC AGT GGA	374
F P G L S H P G D S A T P N P L H T S G	

CTA ATT TTA CCG CCG GAC GCA GCT ACT GCC GAT CTC TTG GAA ATT GTT GTC GAC AAT GGC 434
L I L R P D A A T A D L L E I V V D N G

GAC TGT TTT TTC AGC AAT GGA AAC AAT GTG TCT GGG CCT GAT TAT CTC CTC ACA ATG GAT 494
D C F F S N G N N V S G P D Y L L T M D

CTA AGA ACC AAG AAA GTG ATT TCG CAG ATC CGA CTC AAC GAT ATA AGC AAT GGC ACT TAT 554
L R T K K V I S Q I R L N D I S N G T Y

GCT GGT TAT GCT GAT GCT GAG CTT GCA AGT GAT GGA AAC TCT TAC GTT GTT GGC ACC TAC 614
A G Y A D A E L A S D G N S Y V V G T Y

GTG TCT AAC ATC TTG CGC GTT ACA CCT CAA TCA GAA GTG TCG ACT TTC TTC GTC CAA GAG 674
V S N I L R V T P Q S E V S T F F V Q E

CCT CTT GGC CCA CCC CGA GAA TAT GGC TAC ACT GGG CTC GCT CAT GTC GGT AAC GTC CTT 734
P L G P P R E Y G Y T G L A H V G N V L

CTC TCT AAT GAC AAC ATT GCG AAG CAA TTA GTG CGT TTC GAC ATC CGA GAC GAA AAG GGG 794
L S N D N I A K Q L V R F D I R D E K G

ACG CCG GTT TTT ATT CCT CAG ACG CCA TAT CAC GAA TTC ACA ACC TCC AAT GTA ATG AAT 854
T P V F I P Q T P Y H E F T T S N V M N

TTG CCT GAA AAA TAC AAC AAC ACG ATT CTT CTA GCA GCA GAA AAT GTG ACA CCG GAT CAT 914
L P E K Y N N T I L L A A E N V T P D H

CCA TCT GGG GGA GTG GCT GTT TGG AGG TCC CGA GAT CAG CTA TAC AAT GAG GTC GAG TAT 974
P S G G V A V W R S R D Q L Y N E V E Y

TTG GGT TTC ATT CCC AGC CCG TTG ACC AAC GCC TTA GCG ACA GCT GCT CGG CAA ATG TCC 1034
L G F I P S R L T N A L A T A A R Q M S

GAT CGA ATA TAC GTA GTT TCA GTC TAC ACA GAT GGC GCA AAT ATT ACT GTT GCT GGA TAC 1094
D R I Y V V S V Y T D G A N I T V A G Y

AGC AGC GAG TTC GTG CTT CAA GAT ATC ACG GTC GAG GTA GAT GCT CTT GTA GCA TGA 1151
S S E F V L Q D I T V E V D A L V A .

Secuencia parcial del gen *hmgR* (Acc. No. HE965020).

TGT TGT TGT TGC TCT CTT GGC TAG CAC GTC CTA CGT TGG CTT GCT CCA AGA GAC TCT GCT 60
V V V A L L A S T S Y V G L L Q E T L L

TGG AAG CCC CAC CAA CGT GGG TAA GGC AGA ATG GTC GTC GCT GGC TGA GGG CAG CAG AGA 120
G S P T N V G K A E W S S L A E G S R D

TCT GAT TGC CGG CCC TGA GAC CGG CTG GAA ATG GCA AAA TGT AGA GCA AGG CTC TGG TTC 180
L I A G P E T G W K W Q N V E Q G S G S

CTC TGA CGA GGC TGA CCA CCT TGC CCT CCT GAC ACT CGT CTT CCC CGA GAT CGT TTC AAC 240
S D E A D H L A L L T L V F P E I V S T

GGA TGC GGC AGC TGC TGC TCC GCA CTC CCA TGC TGT GCC TTC TCC TAA GAA CCT TTC TGT 300
D A A A A A P H S H A V P S P K N L S V

CAC TGC CCT GCC TGC CAC TAT CAA CTC TTT TGC CGC CTA TGC GCG TGA TAG CGT CCT GGC 360
T A P L A T I N S F A A Y A R D S V L A

TTA TTC CGT GCC CTA TGA ACA GGC GCC AGA GTT TAT CGC TGC TGC GCA AGA GAT CCC TCT 420
Y S V P Y E Q A P E F I A A A Q E I P L

TGA GAA TGC CCA GGA GAC TGA GAC TCA GCA TGG TCG TGA GAA GAA GAT GTG GAT CAT GAA 480
E N A Q E T E T Q H G R E K K M W I M K

GGC GGC CAA GGT CGA CGC TGG TAA CAA CCT CGT GCT GTG GGT TCG CGA TGC TTG GTC CAA 540
A A K V D A G N N L V L W V R D A W S K

GTT CCT CGA TCT CTT GAA GAA CGC CGA GAC GCT CGA CAT CAC AAT CAT GAT CCT CGG TTA 600
F L D L L K N A E T L D I T I M I L G Y

CCT CGC CTG CAC ATC ACG TTC GTC TCC TCT CTT TCT TGT TCT AAT GCG TTC GTC TTG GGA 660
L A C T S R S S P L F L V L M R S S W D

TCC CAC TTT TTG GTT GGG GTA TGA CCG ACC ACT CCT TTC TCC TCC ACT TTT GGC CC 716
P T F W L G Y D R P L L S P P L L A

Secuencia parcial del gen *dpp1* (Acc. No. HE866933).

ACT CAT GCG CCA GAC TAT GTC GGC TTC ATA ATC CTC CTC GCA GGA TGG ATC TT ggtgcgccct
 T H A P D Y V G F I I L L A G W I L

ccctaacaatcgccatcagcctccctcgccgcggtttattactcgaacaacttccgctta G TCA TTG TCC TCG
 V I V L

TCA ATC CAT TTC ATC GCA TGT TCT TCA TCA ACG ACC TCC GCA TCT CGT ATC CCC ACG CCG
 V N P F H R M F F I N D L R I S Y P H A

AGC ATG AGC GAG TCC CCG TCC gtacgtccaccagcagcgcacgtgcttcactctcactctcacccttgattct
 E H E R V P V

ctcatcttgctaatcaaaacttctttctctcaacag CTC TCA ACT TCT TGT ATG CTC TCT TCA TCC
 P L N F L Y A L F I

CCC TAG GCA TCC TCA TCG CCT ACA ACA
 P L G I L I A Y N

Secuencia parcial del gen *erg1* (Acc. No. HE965019).

GTG CTA CGG CTA CAA CGT CAT CTA TCA CCG AGA GCC ATG CGC CAT TCC ATA TCC AGG ACT 60
 C Y G Y N V I Y H G E P C A I P Y P G L

CAA TGA TAA GGG CGA GGT GAC ACA TGC GTG GGG AGG AAG AGG GAC GGG TGG GAC GAG GCA 120
 N D K G E V T H A W G G R G T G G T R Q

GCA AGG ATG CGG TTT TCA CCA CGG CAA GTT CAT CAC GCA GCT CCG GAA GGC GTG CTT GGG 180
 Q G C G F H H G K F I T Q L R K A C L G

CCA CAA GAA CAT CAC GGT TGT CGA GAC GGA GGT TGT CAA GAC CAT TCG AGG CGA GCA CAC 240
 H K N I T V V E T E V V K T I R G E H T

AGA GCA AAT CTT GGG CGT GGA ATC ACG GAC CAC GGT CAA CAA GGA GAC GGG CGA GAA GAA 300
 E Q I L G V E S R T T V N K E T G E K K

GAG CGA CTA CTT CTT CGG CCA GCT GAC CAT TGT CGC CGA CGG ATA TGA TTC CAA GTT CCG 360
 S D Y F F G Q L T I V A D G Y D S K F R

GAA GCA GGT CCT CGA GAC AAA GCC CGT CGT CAA GAG CAA GTT CTA TGC CC 410
 K Q V L E T K P V V K S K F Y A

Secuencia parcial del gen *erg7* (Acc. No. HE974352).

GTC GAC ATG GAA GAT GCA AAT ACC GAC TAT TCA AAT TTG GCG CCA GTT AAT GCG CCA ATG 60
 V D M E D A N T D Y S N L A P V N A P M

AAC ACA CTG GTT TGT TAC ATC CGA GAT GGC CCT GAT GCG TAC AGT GTC AAG AGA CAC CTT 120
 N T L V C Y I R D G P D A Y S V K R H L

GAA CGA CTG GAA GAA AGT TTA TGG ATG AAG GAT GAA GGA TTG CTA TGC AAC GGC ACA AAC 180
 E R L E E S L W M K D E G L L C N G T N

GGC GTC CAG TGC TGG GAC ACT GCT TTT GCG ATC TTG GCG ATA GTC GAG TCG GGG CTG CAT 240
 G V Q C W D T A F A I L A I V E S G L H

GTC AAA GAA CGC TGG CGA CCC ATG CTG ATC AAA GCC CTT CAG TAT CTG GAT AGG CAA CAG 300
 V K E R W R P M L I K A L Q Y L D R Q Q

ATC AGA GAG AAC TGT GTA GAC CAG GAA AAG TGC TAC CGA CAG CCT CGG AAA GGT GGC TGG 360
 I R E N C V D Q E K C Y R Q P R K G G W

CCG TTC AGC AAC AAG GAT CAG GGA TAC GGC GTG AGC GAT TGC ATT TCG GAA GCG CTC AAG 420
 P F S N K D Q G Y G V S D C I S E A L K

GCC GTC ATC TTG CTT CAG AAA ACG GAA GGC TAC CCG CAG CTT CTT GAC GAC CAA CGC ATC 480
 A V I L L Q K T E G Y P Q L L D D Q R I

TAT GAT GCC GTC GAC ACG CTG CTG CTG TAT CAG AAC GAT AAC GGC GCG GTT TCG TCA TAT 540
 Y D A V D T L L L Y Q N D N G A V S S Y

GAG GCG AGA AGA GGT AGC GAA TAC CTG GAG CTG CTT AAT GCG GCC GAG GTA TTT GGC AGA 600
 E A R R G S E Y L E L L N A A E V F G R

ATC ATG ATT GAA TAC GAC 618
 I M I E Y D

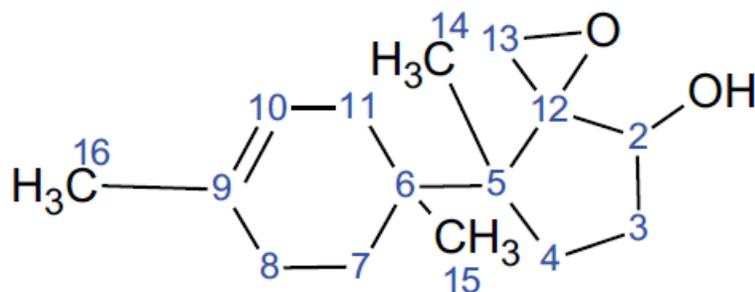
Secuencia parcial del gen *erg9* (Acc. No. HF548663)

GCC TCG ACA CAA TTG AGG ATG ACA TGA CCA TTC CTC TCT CCA CCA AGG TCC CTA TAC TGC	60
L D T I E D D M T I P L S T K V P I L R	
GGG AAT TCC ATG TGA CAA TAG ATC AGG ACG GCT GGC AGT ACC ACG ACA GCA AGG AGA AAG	120
E F H V T I D Q D G W Q Y H D S K E K D	
ACA GAG AGC TCC TGG AGA AGT TTG ACG TTG TGG TCA CCG AGC TCA AGA AGA TCA AGA AGC	180
R E L L E K F D V V V T E L K K I K K P	
CCT ACT ATG ATA TCA TCA AAG ACA TGA CTT ATA AGA TGG GCA ACG GCA TGG CTG ACT ATG	240
Y Y D I I K D M T Y K M G N G M A D Y A	
CTG AAA ATA CCG AAA TGA TCA AAA ACG GCG TAC AGA CCG TCA AGG AAT ATG AGC TGT ACT	300
E N T E M I K N G V Q T V K E Y E L Y C	
GTC ACT ACG TTG CGG GGT TGG TTG GCG AGG GCC TAA CTC GGC TAT TTG TGG CTT CGC AAC	360
H Y V A G L V G E G L T R L F V A S Q L	
TTG CCA ACC CAA AGC TGG CTG AGA GGC CCT CCC TGA CCG AGT CCA TGG GTC AGT TCT TGC	420
A N P K L A E R P S L T E S M G Q F L Q	
AGA AGA CAA ATA TCA TCC GTG ATA TCC ATG AAG ATT GGC AAG ACG GCC GAC GAT GGT ACC	480
K T N I I R D I H E D W Q D G R R W Y P	
CGA AGG AGA TTT GGA GCC AGC ACG TTG AGC GAT GGG AAG ATT TAT TTG ACC CCA AGT ACA	540
K E I W S Q H V E R W E D L F D P K Y R	
GAC CGC AGG CAG TCA ACT GCA TAT CAG CCA TGG TAC TTG ATG CGC TGA AG	
P Q A V N C I S A M V L D A L K	

ANEXO 3: espectros de NMR.

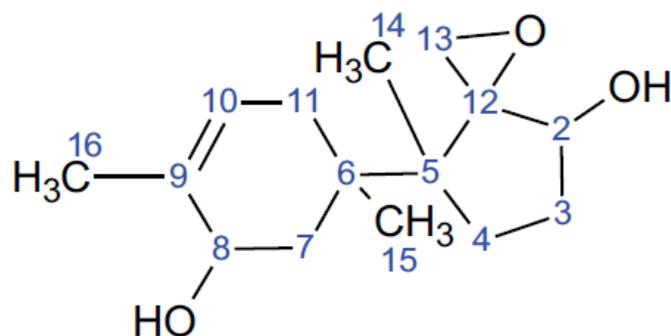
Compuesto 1			Harzianum A *	
No.	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
2β	79.1	3.88 d (5.2)	79.1	3.87 d (5.4)
3α	36.8	2.59 dd (15.5, 7.6)	36.8	2.59 dd (15.6, 7.5)
3β		2.08 ddd (15.6; 5.3; 3.6)		2.08 ddd (15.6; 5.2; 3.6)
4α	75.2	5.66 dd (7.8; 3.4)	75.2	5.66 dd (7.8; 3.3)
5	49.2		49.2	
6	40.4		40.4	
7α	24.5	1.44 dbr (12.0)	24.4	1.44 m
7β		1.94 m		1.94 m
8α	28.0	1.99 m	28.0	1.99 m
8β		1.99 m		1.99 m
9	140.6		140.2	
10	118.4	5.42 dd (5.3; 1.1)	118.5	5.42 d (4.2)
11α	70.6	3.65 d (5.4)	70.6	3.64 d (5.4)
12	65.7		65.5	
13α	48.1	3.17 d (4.0)	47.9	3.16 d (3.9)
13β		2.87 d (4.0)		2.86 d (3.9)
14	6.2	0.73 s	6.1	0.73 s
15	16.1	0.96 s	16.0	0.97 s
16	23.4	1.72 s	23.2	1.72 s
1'	165.8	5.88 d (11.6)	165.6	5.87 d (11.4)
2'	121.4	6.68 t (11.6)	121.4	6.66 t (11.4)
3'	142.9	7.95 dd (14.9; 11.6)	142.6	7.95 dd (15.0; 11.5)
4'	136.7	6.58 dd (14.9; 11.3)	136.5	6.57 dd (15.0; 11.4)
5'	137.5	7.52 dd (15.2, 11.3)	137.3	7.51 dd (15.3, 11.4)
6'	145.9	6.02 d (15.2)	145.6	6.02 d (15.3)
7'	123.4		123.3	
8'	171.5		170.9	

Tabla 24. ¹HNMR (500 MHz) y ¹³CNMR (125 MHz) del HA (este trabajo) (CDCl₃) (δppm, J in Hz). (*): ¹HNMR (600 MHz) y ¹³CNMR (150 MHz) del Harzianum A (CDCl₃) (Corley *et al.*, 1994).



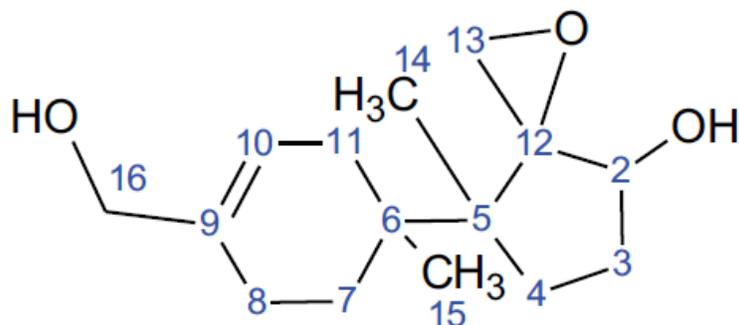
Posición	¹ H shift (ppm)	coupling		¹³ C shift	multiplicity
1	-			-	
2	3.69	dd, 3.5, 5.0		77.9	CH
3ab	1.90; 1.54			30.1	CH ₂
4ab	2.25; 1.43			33.7	CH ₂
5	-			46.8	C
6	-			35.9	C
7ab	1.46; 1.45			28.1	CH ₂
8	1.97; 1.84			27.1	CH ₂
9	-			131.9	C
10ab	5.28			120.0	CH
11ab	2.21; 1.69			33.3	CH ₂
12	-			70.6	C
13ab	3.20; 2.99	d, 4.6; d, 4.6		49.1	CH ₂
14	0.99			18.8	CH ₃
15	0.89			19.0	CH ₃
16	1.63			22.6	CH ₃

Tabla 25. NMRs del 12,13-epoxitrichoen-2-ol.



Posición	¹ H shift (ppm)	coupling		¹³ C shift	multiplicity
1	--			-	
2	3.67	dd, 3.4, 5.4		78.1	CH
3ab	3.20; 3.00			30.1	CH ₂
4ab	2.25; 1.44			33.9	CH ₂
5	-			46.9	C
6	-			35.6	C
7ab	1.75; 1.75			37.9	CH ₂
8	4.03			67.1	CH
9	-			134.0	C
10	5.39			122.3	CH
11ab	2.17; 1.81			34.0	CH ₂
12	-			70.6	C
13ab	3.20; 3.00	d, 4.5; d, 4.5		49.3	CH ₂
14	0.98			18.8	CH ₃
15	1.09			21.6	CH ₃
16	1.75			20.1	CH ₃

Tabla 26. NMRs del 12,13-epoxitrichoen-2,8-diol.



Posición	¹ H shift (ppm)	coupling		¹³ C shift	multiplicity
1	--			-	
2	3.70	dd, 3.4, 5.5		77.9	CH
3ab	1.90; 1.55			30.1	CH ₂
4ab	2.25; 1.44			33.7	CH ₂
5	-			46.9	C
6	-			36.4	C
7ab	1.52; 1.44			27.8	CH ₂
8	2.00; 2.00			22.6	CH ₂
9	-			136.8	C
10ab	5.55			120.0	CH
11ab	2.25; 1.75			33.0	CH ₂
12	-			70.6	C
13ab	3.21; 3.00	d, 4.6; d, 4.6		49.1	CH ₂
14	1.00			18.8	CH ₃
15	0.90			19.1	CH ₃
16ab	3.92; 3.92			65.9	CH ₂

Tabla 27. NMRs del 12,13-epoxitrichoen-2,16- diol.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Ahn, I.P., Lee, S.W. and Suh, S.C. (2007). Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Mol Plant Microbe Interact.* 20(7):759-768.

Alexander, N.J., Hohn, T.M. and McCormick, S.P. (1998). The *TRI11* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 64(1):221-5.

Alexander, N.J., McCormick, S.P. and Hohn, T.M. (1999). TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Mol Gen Genet.* 261(6):977-84.

Alexander, N.J., McCormick, S.P. and Hohn, T.M. (2002). The identification of the *Saccharomyces cerevisiae* gene AYT1(ORG-YLL063c) encoding an acetyltransferase. *Yeast* 19(16):1425-1430.

Alexander, N.J., McCormick, S.P., Larson, T.M. and Jurgenson, J.E. (2004). Expression of *Tri15* in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr Genet.* 45(3):157-62.

Alexander, N.J., McCormick, S.P. and Blackburn, J.A. (2008). Effects of xanthotoxin treatment on trichothecene production in *Fusarium sporotrichioides*. *Can J Microbiol.* 54(12):1023-1031.

Aliferis, K.A. and Jabaji, S. (2010). Metabolite composition and bioactivity of *Rhizoctonia solani* sclerotial exudates. *J Agric Food Chem.* 58(13):7604-7615.

Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T. and Harman, G.E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol.* 65(7):2926-33.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403,410.

Asadollahi, M.A., Maury, J., Schalk, M., Clark, A. and Nielsen, J. (2010). Enhancement of farnesyl diphosphate pool as direct precursor of sesquiterpenes through metabolic engineering of the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* 106(1):86-96.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds.) (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Edited by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience John Wiley and Sons, New York.

Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S-H., Strem, M.D., Melnick, R.L. and Bailey, B.A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J Exp Bot.* 60(11):3279-95.

Baker, K.F., and Cook, R.J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman and company, San Francisco.

Beijerinck, M.W. (1908). Die Erscheinung der Glockenbildung oder Agglutination bei Alkoholhefen. *Centralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. II Abt.* 20:641-650.

Bélanger, R.R., Dufour, N., Caron, J. and Benhamou, N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Bio Sci Tech.* 5(1):41-54.

- Benhamou, N. and Chet, I.** (1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol.* 63(5):2095-2099.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. and Codón, A. C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol.* 7(4):249-260.
- Bennett, J.W.** (1983). Differentiation and secondary metabolites in mycelial fungi. In: Bennett, J.W., Ciegler, A. (eds) *Secondary metabolism and differentiation in fungi*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-32.
- Bennett, J.W. and Klich, M.** (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16(3): 497-516.
- Beremand, M.N.** (1987). Isolation and characterization of mutants blocked in T-2 toxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 53(8):1855-9.
- Berg, J.M. and Godwin, H.A.** (1997). Lessons from zinc-binding peptides. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 26:357-371.
- Bottini, A.T., Bowen, J.R. and Gilchrist, D.G.** (1981). Phytotoxins II. Characterization of a phytotoxic fraction from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Tetrahedron Lett.* 22 (29): 2723-2726.
- Boutigny, A., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M., Pinson-Gadais, L. and Richard-Forget, F.** (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res.* 113:746-753.
- Bradford, M.M.** (1986). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72(7):248-254.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. and Chet, I.** (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* 147(2):779-89.
- Brown, D.W., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H. and Desjardins, A.E.** (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol.* 32(2):121-33.
- Brown, D.W., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H. and Desjardins, A.E.** (2002). Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet Biol.* 36(3):224-33.
- Brown, D.W., Dyer, R.B., McCormick, S.P., Kendra, D.F. and Plattner, R.D.** (2004). Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genet Biol.* 41(4):454-462.
- Calvet, C., Pera, J. and Barea, J.M.** (1993). Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant Soil* 148(1):1-6.
- Cane, D.E.** (1990). Enzymatic formation of sesquiterpenes. *Chem Rev.* 90(7): 1089-1103.
- Cardoza, R.E., Hermosa, M.R., Vizcaíno, J.A., Sanz, L., Monte, E., and Gutiérrez, S.** (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. In: Mellado, E., Barredo, J.L.(Eds.), *Microorganism for Industrial Enzymes and Biocontrol*, pp.1-22.
- Cardoza, R.E., Vizcaino, J.A., Hermosa, M.R., Monte, E. and Gutiérrez, S.** (2006). A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Microbiol.* 44(4):383-395.
- Cardoza, R.E., Hermosa, M.R., Vizcaíno, J.A., González, F., Llobell, A., Monte, E. and Gutiérrez, S.** (2007). Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase encoding gene in *Trichoderma*

harzianum CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and a lower antifungal activity. *Fungal Genet Biol.* 44(4):269-283.

Chaverri, P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J. and Geiser, D. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol. Phylogenet Evol.* 27(2):302-313.

Chen, F., Zhang, J., Song, X., Yang, J., Li, H., Tang, H. and Liao, Y.-C. (2011). Combined metabonomic and quantitative real-time PCR analyses reveal systems metabolic changes of *Fusarium graminearum* induced by *Tri5* gene deletion. *J Proteome Res.* 10(5):2273-2285.

Chet, I. (1990). Mycoparasitism—recognition, physiology and ecology. In R.R.Baker and P.E.Dunn (eds), *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Alan Liss, New York, pp. 725-733.

Chet, I. and Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol.* 48(1):37-43.

Chomczynski, P. and Sacchi, M. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.

Clarke, L.L. and Carbon, J.J. (1976). A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell.* 9(1):91-9.

Cole, R.A. and Cox, R.H. editors. (1981). Handbook of toxic fungal metabolites. New York: Academic Press.

Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Mewman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. and Mauch-Mani, B. (2006). Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact.* 19(10):1062-1071.

Cook, R.J. (1997). Biological control of soilborne plant pathogens: past, present and future. In: Proceedings of the International Symposium of Clean Agriculture Vol. pp. 35-48.

Cooney, J.M. and Lauren, D.R. (1998). *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the fungal/pathogen interface using a tubular bioassay. *Lett Appl Microbiol.* 27(5):283-286.

Cooney, J.M., Lauren, D.R. and di Menna, M.E. (2001). Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *J Agric Food Chem.* 49(1):522-526.

Corley, D.G., Miller-Wideman, M. and Durley, R.C. (1994). Isolation and structure of harzianum A: a new trichothecene from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod.* 57(3):422-5.

Dalmás, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I.G. and Viaud, M. (2011). The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol Plant Pathol.* 12(6):564-579.

De Groot, J.M., Bundock, P., Hooykaas, P.J. and Beijersbergen, A.G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol.* 16(9):839-842.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. and Hofte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol.* 104(3):279-286.

Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Nirenberg, H.I., Gams, W. and Brückner, H. (2006). *Trichoderma brevicompactum* complex: rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (Peptaibiotics). *J Agric Food Chem.* 54(19):7047-7061.

- Degenkolb, T., Dieckmann, R., Nielsen, K.F., Gräfenhan, T, Theis, C., Zafari, D., Chaverri, P., Isamaiel, A., Brückner, H., von Döhren, H., Thrane, U., Petrine, O. and Samuels, G.J.** (2008). The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycol Progress*. 7(3):177-219.
- Delgado-Jarana, J., Pintor-Toro, J.A. and Benítez, T.** (2000) Overproduction of β -1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. *Biochim Biophys Acta* 1481(2):289-296.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D. and Vanmiddlesworth, F.** (1986). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*: Origin of the Oxygen Atoms of T-2 Toxin. *Appl Environ Microbiol*. 51(3):493-497.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D. and Beremand, M.N.** (1987). Ancymidol blocks trichothecene biosynthesis and leads to accumulation of trichodiene in *Fusarium sporotrichioides* and *Gibberella pulicaris*. *Appl Environ Microbiol*. 53(8):1860-1865.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D. and Spencer, G.F.** (1988). Inhibition of trichothecene toxin biosynthesis by naturally occurring shikimate aromatics. *Phytochemistry*. 27(3):767-771.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M. and McCormick, S.** (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiol Rev*. 57(3):595-604.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G.H., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G. and Hohn, T.M.** (1996) Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Mol Plant Microbe Interact*. 9(9):775-781.
- Dickinson, M.** (2003). Resistance mechanism in plants. In Molecular plant pathology. Dickinson, M (ed). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, pp. 160-173.
- Díez, B., Gutiérrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H. and Martín, J.F.** (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the pcbAB gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase and linkage to the pcbC and penDE genes. *J Biol Chem*. 265(27):16358-65.
- Domínguez, M.** (2005). Las toxinas como agresivos químicos: micotoxinas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia: pp. 121-187. <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/547/565>.
- Druzhinina, I. and Kubicek, C.P.** (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J Zhejiang Univ Sci B*. 6(2):100-112.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P.** (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol*. 9(10):749-59.
- Dubos, B., Jailloux, F. and Bulit, J.** (1982) Protection du vignoble contre la pourriture grise: les propriétés antagonistes du *Trichoderma* à l'égard du *Botrytis cinerea*. Les Colloques de l'INRA 11: 205-219.
- Duran-Patron, R., Hernandez-Galan, R., Rebordinos, L. G., Cantoral, J. M. and Collado, I. G.** (1999). Structure-activity relationships of new phytotoxic metabolites with the botryane skeleton from *Botrytis cinerea*. *Tetrahedron* 55(8):2389-2400.
- Dyer, R.B., Plattner, R.D., Kendra, D.F. and Brown, D.W.** (2005). *Fusarium graminearum* TRI14 is required for high virulence and DON production on wheat but not for DON synthesis in vitro. *J Agric Food Chem*. 53(23):9281-7.

- Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P. and Haas, H.** (2004). Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC- mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Euk Cell*. 3(2):561-563.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N.** (2004). *Botrytis*: biology, pathology and control. Dordrecht, The Netherland.
- Engler, K. H., Coker, R. and Evans, I.H.** (1999). A novel colorimetric yeast bioassay for detecting trichothecene mycotoxins. *J Microbiol Methods*. 35(3):207-218.
- FAO (2003)**. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudio FAO: Alimentación y nutrición 81, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- Fernández, F.J.** (2006). Aplicación de la proteómica a la caracterización de mecanismos de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz, Cádiz, España.
- Fox, M.E. and Howlett, B.J.** (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr Opin Microbiol*. 11(6):481-487.
- Freeman, G.G. and Morrison, R.I.** (1948). Trichothecin: an antifungal metabolic product of *Trichothecium roseum* Link. *Nature* 162(4105):30.
- Gallo, A., Mulé, G., Favilla, M. and Altomare, C.** (2004). Isolation and characterisation of a trichodieno synthase homologous gene in *Trichoderma harzianum*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 65(1):11-20.
- Gams, W., Van der Aa, H. A., Van der Okaats-Niterink, A. J., Samson, R. A. and Stalpers, J. A.** (1987). CBS Course of mycology. Centralbureau voor Schimmel cultures, Berna, Suiza.
- Genoscope** (2005). *Botrytis cinerea*. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40% of the harvest, depending on climatic conditions.
- Gietz, R.D., St. Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*. 20(6):1425.
- Goswami, J., Pandey, R.K., Tewari, J.P. and Goswami, B.K.** (2008). Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. *J Environ Sci Health B*. 43(3):237-40.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M.D., Mateos, P.F., Bridge, P.D., Monte, E. and Garcia-Acha, I.** (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 63(8):3189-3198.
- Grove, J.F.** (2007). The trichothecenes and their biosynthesis. *Fortschr Chem Org Naturst*. 88:63-130.
- Hammond-Kosack, K. and Jones, J.D.G.** (2000). Responses to plant pathogens. In B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones (eds), *Biochemistry and Molecular Biology of plants*, American Society of Plant Physiologists, Maryland, pp. 1102-1156.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166(4):557-580.
- Handelsman, J., and Stabb, E.** (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*. 8(10):1855-1869.

- Harman, G.E.** (1990). Deployment tactics for biocontrol agents in plant pathology. In R.R. Baker and P.E. Dunn (eds), *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*, Alan Liss, New York, pp. 779-792.
- Harman, G.E.** (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84:377-93.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M.** (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2(1):43-56.
- Harman, G.E.** (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96(2):190-94.
- Harris, L.J., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nicholson, P., Butler, G., Young, J.C., Weston, G., Proctor, R.H. and Hohn, T.M.** (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Dis.* 83(10):954-960.
- Hayes, C.K., Harman, G.E., Woo, S.L., Gullino, M.L. and Lorito, M.** (1993). Methods for electrophoretic karyotyping of filamentous fungi in the genus *Trichoderma*. *Anal. Biochem.* 209(1):176-182.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Díaz-Mínguez, J.M., Castro, C., Monte, E. and García-Acha, I.** (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol.* 66(5):1890-1898.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. and Monte, E.** (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158(Pt 1):17.25.
- Hesketh, A.R., Gledhill, L., Marsh, D.C., Bycroft, B.W., Dewick, P.M., and Gilbert, J.** (1990) Isotrichodiol: a post-trichodiene intermediate in the biosynthesis of trichothecene mycotoxins. *J Chem Soc, Chem Commun.* 17:1184-1186.
- Hesketh, A.R., Gledhill, L., Bycroft, B.W., Dewick, P.M. and Gilbert, J.** (1993). Potential inhibitors of trichothecene biosynthesis in *Fusarium culmorum*: epoxidation of a trichodieno derivative. *Phytochemistry* 32(1):93-104.
- Hjeljord, L. and Tronsmo, A.** (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an Overview. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 2). C.P. Kubicek and G.E. Harman (eds). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, pp.115-133.
- Hohn, B. and Murray, K.** (1977). Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74(8):3259-3263.
- Hohn, T.M. and Vanmiddlesworth, F.** (1986). Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthetase from *Fusarium sporotrichioides*. *Arch Biochem Biophys.* 251(2):756-761.
- Hohn, T.M. and Beremand, P.D.** (1989). Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79(1):131-138.
- Hohn, T.M., McCormick, S.P. and Desjardins, A.E.** (1993). Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr Genet.* 24(4):291-295.
- Hohn, T.M., Desjardins, A.E., and McCormick, S.P.** (1995) The *Tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol Gen Genet.* 248(1):95-102

- Hohn, T.M., Krishna, R. and Proctor, R.H.** (1999). Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genet Biol.* 26(3):224-235.
- Holmes, D.S. and Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 114(1):193-197.
- Hopp, T. P., and Woods, K.R.** (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 78(6):3824-3828.
- Hooykaas, P.J.J., Roobol, C. and Schilperoort, R.A.** (1979). Regulation of the transfer of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Gen Microbiol.* 110(1):99-109.
- Howell, C.R. and Stipanovic, R.D.** (1995). Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85(4): 469-472.
- Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D. and Puckhaber, L.S.** (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90(3):248-252.
- Howell, C.R.** (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87(1):4-10.
- Hubbard, J., Harman, G. and Hadar, Y.** (1983). Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seed. *Phytopathology* 73(5):655-659.
- Idnurm, A. and Howlett, B. J.** (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol.* 2(4):241-255.
- Inbar, J. and Chet, I.** (1992). Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J. Bacteriol.* 174(3):1055-1059.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-28.
- Invitrogen** (2008). Handbook for Real-Time PCR: from theory to practice.
- ISTH (International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy)**, 2008. ISTH.info— a Website of Trichoderma DNA BarCode [WWW]. Irina Druzhinina & Alexey Kopchinskiy. Available from <http://www.isth.info> (accessed 20/08/2008).
- Jarvis, B.B.** (1992). Macrocyclic trichothecenes from Brazilian *Baccharis* species: From microanalysis to large scale isolation. *Phytochem Anal.* 3(6):241-249.
- Jin, H.Z., Lee, J.H., Zhang, W.D., Lee, H.B., Hong, Y.S., Kim, Y.H. and Lee, J.J.** (2007). Harzianums A and B produced by a fungal strain, *Hypocrea* sp. F000527, and their cytotoxicity against tumor cell lines. *J Asian Nat Prod Res.* 9(3-5):203-207.
- Kasparovsky, T., Milat, M.L., Humbert, C., Blein, J.P., Havel, L. and Mikes, V.** (2003). Elicitation of tobacco cells with ergosterol activates a signal pathway including mobilization of internal calcium. *Plant Physiol Biochem.* 41(5):495-501.
- Keller, N.P. and Hohn, T.M.** (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 21(1):17-29.
- Keller, N.P., G. Turner, and J.W. Bennett.** (2005). Fungal secondary metabolism- from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol.* 3(12):937-947.

- Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K. and Yamaguchi, I.** (1998). Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of *Tri101*. *J Biol Chem.* 273(3):1654-1661.
- Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T.J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T. and Yamaguchi, I.** (2003). The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Lett.* 539(1-3):105-110.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Oshato, S. and Fujimura, M.** (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(9):2105-2123.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A.** (2001). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford, UK.
- Klein, D. and Eveleigh, D.E.** (1998) Ecology of *Trichoderma*. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis, London, pp 57-74.
- Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Wo(1)o, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C.P. and Druzhinina, I.S.** (2007) Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Appl Environ Microbiol.* 73(22):7415-7426.
- Kraus, G., Druzhinina, I., Gams, W., Bissett, J., Zafari, D., Szakacs, G., Koptchinski, A., Prillinger, H., Zare, R. and Kubicek, C.** (2004). *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia* 96(5):1059-1073.
- Kubicek, C., Eveleigh, D.E. Esterbauer, H., Steiner, W. and Kubicek-Pranz, E.M.** (1990). *Trichoderma reesei* cellulases: biodiversity, genetics, physiology and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C. and Szakacs, G.** (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biol.* 38(3):310-319.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T. and Kubicek C.P.** (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(15):7755-7760.
- Kullnig, C., Mach, R.L., Lorito, M. and Kubicek, C.P.** (2000) Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Appl Environ Microbiol.* 66(5):2232-2234.
- Latorre, B.A., Lillo, C. and Rioja, M.E.** (2001). Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. *Cien Inv Agr.* 28(2):61-66.
- Lazo, G.R., Stein, P.A. and Ludwig, R.A.** (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* 9(10):963-967.
- Lee, T., Han, Y.K., Kim, K.H., Yun, S.H. and Lee, Y.W.** (2002). *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl Environ Microbiol.* 68(5):2148-54.

- Lee, H.B., Kim, Y., Jin, H.Z., Lee, J.J., Kim, C.-J., Park, J.W. and Jung, H.S.** (2005). A new *Hypocrea* strain producing harzianum A cytotoxic to tumour cell lines. *Lett Appl Microbiol.* 40(6):497-503.
- Leichner, G.S., Avner, R., Harats, D. and Roitelman, J.** (2011). Metabolically regulated endoplasmic reticulum-associated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. Evidence for requirement of a geranylgeranylated protein. *J Biol Chem.* 286(37):32150-32161.
- Leslie, J.F., Plattner, R.D., Desjardins, A.E. and Klittich, C.J.R.** (1992). Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Mycotoxigenology* 82(3):341-345.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C.** (1984). A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology* 74(10):1241-1244.
- Lieckfeldt, E., Kulhs, K. and Muthumeenakshi, S.** (1998). Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1). C.P. Kubicek and G.E. Harman (eds). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, pp. 35-56.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Nirenberg, H.I. and Petrini, O.** (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl Environ Microbiol.* 65(6):2418-28.
- Lorito, M., Woo, S.L., D'Ambrosio, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P. and Scala, F.** (1996). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol Plant Microbe Interact.* 9(3):206-213.
- Lorito, M., Woo, S.L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S. and Scala, F.** (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(14):7860-5.
- Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. and Monte, E.** (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu Rev Phytopathol.* 48:395-417.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. and Jansson, J.K.** (2004). In vivo study of *Trichoderma*-Pathogen-Plant Interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Appl Environ Microbiol.* 70(5):3073-3081.
- Luo, Y., Zhang, D.D., Dong, X.W., Zhao, P.B., Chen, L.L., Song, X.Y., Wang, X.J., Chen, X.L., Shi, M. and Zhang, Y.Z.** (2010). Antimicrobial peptides induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. *FEMS Microbiol Lett.* 313(2):120-126.
- Lutz, M.P., Feichtinger, G., Défago, G. and Brion, D.** (2003) Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. *Appl Environ Microbiol* 69(6):3077-3084.
- Machida, Y. and Nozoe, S.** (1972). Biosynthesis of trichothecin and related compounds. *Tetrahedron Lett.* 19:1969-1971.
- Malonek, D., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P. and Tudzynski, B.** (2005). Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes, P450-1 and P450-4, of the gibberellic acid gene cluster in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi* MP-D). *Appl Environ Microbiol.* 71(3):1462-1472.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.** (1982) Molecular cloning: A laboratory manual, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Maier, T., Güell, M. and Serrano, L.** (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*. 583(24):3966-3973.
- Maury, J., Asadollahi, M.A., Møller, K., Schalk, M., Clarck, A. and Nielsen, J.** (2005). Microbial isoprenoid production: An example of green chemistry through metabolic engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 100:19-51.
- McCormick, S.P., Taylor, S.L., Plattner, R.D., and Beremand, M.N.** (1989) New modified trichothecenes accumulated in solid culture by mutant strains of *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol* 55(9):2195-2199.
- McCormick, S.P., Taylor, S.L., Plattner, R.D. and Beremand, M.N.** (1990). Bioconversion of possible T-2 toxin precursors by a mutant strain of *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299. *Appl Environ Microbiol*. 56(3):702-706.
- McCormick, S.P., Hohn, T.M. and Desjardins, A.E.** (1996). Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol*. 62(2):353-359.
- McCormick, S.P. and Hohn, T.M.** (1997). Accumulation of trichothecenes in liquid cultures of a *Fusarium sporotrichioides* mutant lacking a functional trichothecene C-15 hydroxylase. *Appl Environ Microbiol*. 63(5):1685-1688.
- McCormick, S.P., Alexander, N.J., Trapp, S.E. and Hohn, T.M.** (1999). Disruption of *TRI101*, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol*. 65(12):5252-5256.
- McCormick, S.P. and Alexander, N.J.** (2002). *Fusarium Tri8* encodes a trichothecene C-3 esterase. *Appl Environ Microbiol*. 68(6):2959-2964.
- McCormick, S.P., Harris, L.J., Alexander, N.J., Ouellet, T., Saparno, A., Allard, S. and Desjardins, A.E.** (2004). *Tri1* in *Fusarium graminearum* encodes a P450 oxygenase. *Appl Environ Microbiol*. 70(4):2044-2051.
- McCormick, S.P., Alexander, N.J. and Proctor, R.H.** (2006). *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Can J Microbiol*. 52(7):636-642.
- McCormick, S.P., and Alexander, N.J.** (2007). *Myrothecium roridum tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for three oxygenation steps. *Can J Microbiol*. 53(5):572-579.
- McCormick, S.P., Alexander, N.J. and Harris, L.J.** (2010). *CLM1* of *Fusarium graminearum* encodes a longiborneol synthase required for culmorin production. *Appl Environ Microbiol*. 76(1):136-141.
- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A. and Alexander, N.J.** (2011). Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins (Basel)* 3(7):802-814.
- McFarlane, H. H.** (1968). Plant host-pathogen. *Rev Appl Mycol*. 40:1922-1961.
- McIntyre, M., Nielsen, J., Arnau, J., van der Brink, H., Hansen, K. and Madrid, S.** (eds) (2004) Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark.
- McLaughlin, C.S., Vaughan, M.H., Campbell, I.M., Wei, C.M., Stafford, M.E. and Hansen, B.S.** (1977). Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. In: Rodericks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, editors. Mycotoxins in human and health. Park Forest South, IL: Pathotox. pp 263–275.
- Meek, I.B., Peplow, A.W., Ake, C. Jr., Phillips, T.D. and Beremand, M.N.** (2003). *Tri1* encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in

Fusarium sporotrichioides and resides upstream of another new *Tri* gene. *Appl Environ Microbiol.* 69(3):1607-1613.

Meigs, T.E. and Simoni, R.D. (1997). Farnesol as a regulator of HMG-CoA reductase degradation: characterization and role of farnesyl pyrophosphatase. *Arch Biochem Biophys.* 345(1):1-9.

Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratoru Press, New York, EE.UU.

Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol.* 4(1):1-4.

Moran-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Lorito, M. and Monte, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* 22(8):1021-1031.

Mozo, T. and Hooykaas, P.J. (1991). Electroporation of megaplasmids into *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol.* 16(5):917-918.

Mukherjee, M., Horwitz, B.A., Sherkhane, P.D., Hadar, R. and Mukherjee, P.K. (2006). A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens*: evidence from analysis of genes underexpressed in a mutant defective in morphogenesis and antibiotic production. *Curr Genet.* 50(3):193-202.

Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R. and Dobbie, Z. (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32(6):1372-1376.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.

Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16(1):15-24.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultura. *Physiol Plantarum* 15(3):473-497.

Murray, I.A. and W.V. ShaW. (1997). O-acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(1):1-6.

Muthumeenakshi, S., Mills, P.R., Brown, A.E. and Seaby, D.A. (1994). Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* 140(4):769-777.

Nielsen, K., Gräfenhan, T., Zafari, D. and Thrane, U. (2005). Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *J Agric Food Chem.* 53(21):8190-8196.

Nozoe, S. and Machida, Y. (1970). Structure of trichodiene. *Tetrahedron Lett.* 11(31):2671-2674.

Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198(1):249-266.

Osiewacz, H.D. (ed). (2002). Molecular biology of fungal development. Marcel Dekker, New York.

Papavizas, G.C. (1985). *Trichoderma and Gliocladium*: biology and potential for biological control. *Annu Rev Phytopathol.* 19:332-349.

- Paradise, E.M., Kirby, J., Chan, R. and Keasling, J.D.** (2008). Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulation squalene synthase. *Biotechnol Bioeng.* 100(2):371-378.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rätto, M., Salminen, E. and Knowles, J.** (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungi *Trichoderma reesei*. *Gene* 61(2):155-164.
- Peplow, A.W., Tag, A.G., Garifullina, G.F. and Beremand, M.N.** (2003a). Identification of new genes positively regulated by *Tri10* and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Appl Environ Microbiol.* 69(5):2731-2736.
- Peplow, A.W., Meek, I.B., Wiles, M.C., Phillips, T.D. and Beremand, M.N.** (2003b). *Tri16* is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol.* 69(10):5935-5940.
- Persoon, C.H.** (1794). Dipositio metódica fungorum in Classes, Ordines, Familias et Genera. En Nenes Magazin für die Botanik. J.J. Römer (ed), Ziegler und Söhne, Zurich, Alemanis, pp 63-128.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L.** (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *NAR* 30, e36.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S.C.M.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol.* 5(5): 308-316.
- Pinedo, C., Wang, C-M., Prdier, J-M., D., B., Choquer, M., Le Pêcheur, P., Morgant, G., Collado, I.G., Cane, D.E. and Viaud, M.** (2008). Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chem Biol.* 3(12):791-801.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F. and Ouellet, T.** (2007). Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Lett.* 581(3):443-447.
- Price, M.S., Yu, J., Nierman, W.C., Kim, H.S., Pritchard, B., Jacobus, C.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. and Payne, G.A.** (2006) The aflatoxin pathway regulator *AflR* induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol Lett* 255(2):275-279.
- Prins, T. W., Tudzynski, P. and von Tiedemann, A.** (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M., McCormick, S.P. and Desjardins, A.E.** (1995). *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol.* 61(5):1923-1930.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M. and McCormick, S.P.** (1997). Restoration of wild-type virulence to *Tri5* disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology* 143(Pt 8):2583-2591.
- Proctor, R. H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. and Hohn, T.M.** (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet Biol.* 27(1):100-112.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H. and van den Hondel, C.A.** (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56(1):117-124.

- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T.** (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23(23):4878-4884.
- Quidde, T., Buttner, P. and Tudzynski, P.** (1999). Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning of a gene coding for a putative avecinase. *Eur J Plant Pathol.* 105(3):273-283.
- Rebordinos, L., Cantoral, J. M., Prieto, M. V., Hanson, J. R. and Collado, I. G.** (1996). The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 42(2):293-307.
- Reese, E.T. and Mandels, M.** (1989). Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulose. *Ann Rep Ferment.* 7:1-20.
- Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A. and Fanelli, C.** (2010). Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87(3):899-911.
- Rifai, M.A.**(1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap.*116:1-56.
- Rocha, O., Ansari, K. and Doohan, F. M.** (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives & Contaminants* 22(4):369-378.
- Rodríguez, P., Venancio, A., Kozakiewicz, Z. and Lima, N.** (2009) A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int J Food Microbiol* 129(2):187-193.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K-M., Siewers, V., Tenberge, K.B., Tudzynski, B. and Tudzynski, P.** (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol Plant Pathol.* 5(1):17-27.
- Rossard, S., Luini, E., Pérault, J.M., Bonmort, J. and Roblin, G.** (2006). Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. *J Exp Bot.* 57(6):1245-1252.
- Rossard, S., Roblin, G. and Atanassova, R.** (2010). Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *J Exp Bot.* 61(6):1807-1816.
- Rubio, M.B., Hermosa, R., Reino, J.L., Collado, I.G. and Monte, E.** (2008). *Thctf1* transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genet Biol.* 46(1):17-27.
- Rubio, M.B., Domínguez, S., Monte, E., and Hermosa, R.** (2012) Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology* 158(Pt 1):119-128.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., Woo, S.L. and Lorito, M.** (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol Plant Microbe Interact.* 22(3):291-301.
- Sambrook, J.Y. and Russell, D.W.** (2001). Molecular cloning. A laboratory manual 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Samuels, G.J.** (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96(2):195-206.

Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F. and McCray, E.B. (2012). *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved September 20, 2012, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74(12):5463-5467.

Scherm, B., Orrù, M., Balmas, V., Spanu, F., Azara, E., Delogu, G., Hammond, T., Keller, N. and Migheli, Q. (2011). Altered trichothecene biosynthesis in TRI6-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. *Mol Plant Pathol*. 12(8):759-771.

Schuster, A. and Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87(3):787-799.

Schoonbeek, H., Del Sorbo, G. and De Waard, M.A. (2001). The ABC transporter *BcatrB* affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol Plant Microbe Interact*. 14(4):562-571.

Segel, I. (1968). *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

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

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M.A., Oliveira, E. and Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7(21):3943-3952.

Servouse, M. and Karst, F. (1986). Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 240(2):541-547.

Sevim, A., Donzelli, B.G., Wu, D., Demirbag, Z., Gibson, D.M. and Turgeon, B.G. (2012). Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Curr Genet*. 58(2):79-92.

Sharma, R. P. and Kim, Y.W. (1991). Trichothecenes. In *Mycotoxins and Phytoalexins* (R.P. Sharma and D.K. Salunkhe, Eds.), pp. 339-359. CRC Press, Boca Raton, FL.

Shoresh, M., Yedidia, I. and Chet, I. (2005). Involvement of the jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95(1):76-84

Shoresh, M. and Harman, G.E. (2008a). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiol*. 147(4):2147-2163.

Shoresh, M. and Harman, G.E. (2008b). The relationship between increased growth and resistance induced in plants by root colonizing microbes. *Plant Signaling Behav*. 3(9):737-739.

Shoresh, M., Harman, G.E. and Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol*. 48:21-43.

Siewers, V., Kokkelink, L., Smedsgaard, J. and Tudzynski, P. (2006). Identification of an abscisic acid gene cluster in the grey mold *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol*. 72(7):4619-4626.

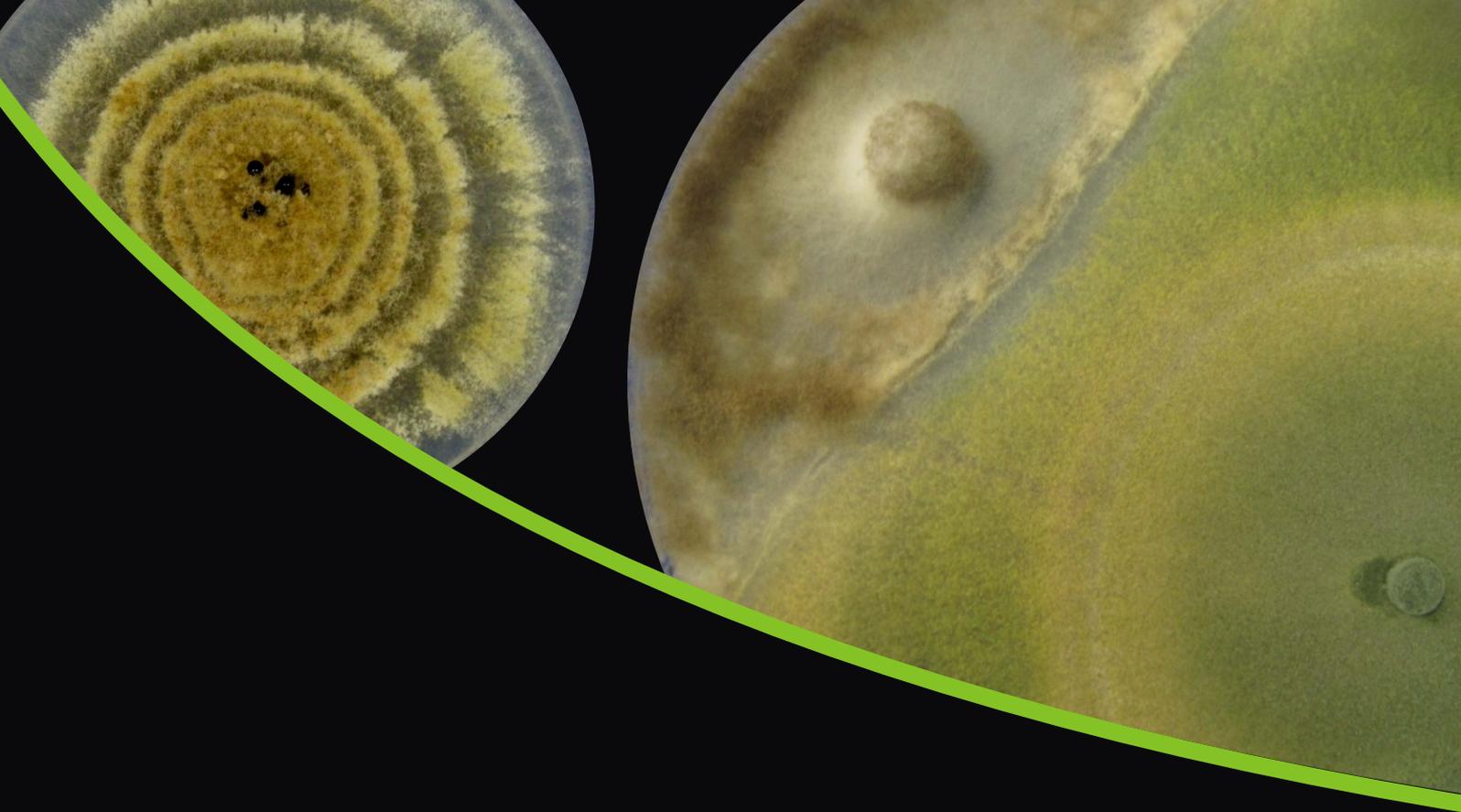
- Sivasithamparam, G.E. and Ghisalberti, E.L. (1998).** Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1). C.P. Kubicek and G.E. Harman (eds). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, pp. 139-191.
- Skory, C.D., Chang, P.K., Cary, J. and Linz, J.E. (1992).** Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmastocystin in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 58(11):3527-3537.
- Smith, D.J., Burnham, M.K.R., Edwards, J., Earl, A.J. and Turner, G. (1990).** Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. *BioTechnology* 8(1):39-41.
- Sousa, S. (2004)** Mejora del sistema de expresión en *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la producción de proteínas de interés biotecnológico. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98(3): 503-517.
- St. Pierre, B. and De Luca, V. (2000).** Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the GAHP superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism, p. 285–315. In J. T. Romeo, R. Ibrahim, L. Varin, and V. DeLuca (ed.), Recent advances in phytochemistry, volume 34, evolution of metabolic pathways. Pergamon, Amsterdam, Netherlands.
- Sukroongreung, S., Schappert, K.T. and Khachatourians, G.G. (1984).** Survey of sensitivity of twelve yeast genera toward T-2 toxin. *Appl Environ Microbiol.* 48(2):416-419.
- Tag, A.G., Garifullina, G.F., Peplow, A.W., Ake, C.Jr., Phillips, T.D., Hohn, T.M. and Beremand, M.N. (2001).** A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Appl Environ Microbiol.* 67(11):5294-5302.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. and Van Kan, J.A.L. (1998).** The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 11(10):1009-1016.
- Tenberge, K. B. (2004).** Morphology and cellular organisation in *Botrytis* interactions with plants. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edited by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Tijerino, A., Hermosa, R., Cardoza, R.E., Moraga, J., Malmierca, M.G., Aleu, J., Collado, I.G., Monte, E. and Gutierrez, S. (2011a).** Overexpression of the *Trichoderma brevicompactum tri5* gene: effect on the expression of the trichodermin biosynthetic genes and on tomato seedlings. *Toxins* 3(9):1220-1232.
- Tijerino, A., Cardoza, R.E., Moraga, J., Malmierca, M.G., Vicente, F., Aleu, J., Collado, I.G., Gutiérrez, S., Monte, E. and Hermosa, R. (2011b).** Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genet Biol.* 48(3):285-296.
- Tokai, T., Koshino, H., Kawasaki, T., Igawa, T., Suzuki, Y., Sato, M., Fujimura, M., Eizuka, T., Watanabe, H., Kitahara, T., Ohta, K., Shibata, T., Kudo, T., Inoue, H., Yamaguchi, I. and Kimura, M. (2005)** Screening of putative oxygenase genes in the *Fusarium graminearum* genome sequence database for their role in trichothecene biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett.* 251(2):193-201.
- Tokai, T., Koshino, H., Takahashi-Ando, N., Sato, M., Fujimura, M. and Kimura, M. (2007).** *Fusarium Tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 353(2):412-417.

- Trapp, S.C., Hohn, T.M., McCormick, S.P. and Jarvis, B.B.** (1998). Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Mol Gen Genet.* 257(4):421-432.
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M. and Lorito, M.** (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol Plant Pathol.* 12(4):341-354.
- Tucker, J.** (Spring 2001). "The Yellow Rain Controversy: Lessons for Arms Control Compliance" (<http://cns.miis.edu/npr/pdfs/81tucker.pdf>). *The Nonproliferation Review*.
- Turgeon, B.G., Garber, R.C. and Yoder, O.C.** (1987) Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. *Mol Cell Biol.* 7(9):3297-3305.
- Ueno, Y.** (1985). The toxicology of mycotoxins. *Crit Rev Toxicol.* 14(2):99-133.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F.** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):0034.1-0034.11.
- Veen, M., Stahl, U. and Lang, C.** (2003). Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4(1):87-95.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L. and Lorito, M.** (2008a) A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathol.* 72(1-3):80-86.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. and Lorito, M.** (2008b). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol Biochem.* 40(1):1-10.
- Viterbo, A. and Chet, I.** (2006). *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol.* 7(4):249-258.
- Vraný, J., Rasocha, V. and Hausvater, E.** (1990). Inoculation of potatoes with microorganisms under field conditions. *Folia Microbiologica.* 35(4):336-347.
- Waterhouse, A. M., Proctor, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. and Barton, G.J.** (2009). Jalview version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9):1189-1191.
- Webster, J. and Lomas, N.** (1964). Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin? *Transactions of the British Mycological Society.* 47(4):535-540.
- Weindling, R.** (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24:1153-1179.
- Werck-Reichhart, D. and R. Feyereisen.** (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1(6):3003.1-3003.9
- Whetzel, H. H.** (1909). A fungus living as parasite upon another fungus. *Ont Nat Sci Bull.* 5:3.
- Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J., Bodo, B. and Kenerley, C.** (2002). Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem.* 277(23):20862-20868.
- Windels, C. E.** (2000). Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the northern Great Plains. *Phytopathology* 90(1): 17–21.

- Woo, S.L. and Lorito, M.** (2006). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, ed. M Vurro, J Gressel, pp. 107–30. Amsterdam: Springer. 295 pp.
- Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, I.** (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol.* 65(3):1061-1070.
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. and Chet, I.** (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil.* 235(2):235-242.
- Yildirim, E., Taylor, A.G. and Spittler, T.D.** (2006). Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. *Sci Hortic.* 111(1):1-6.
- Zamir, D. and Chet, I.** (1985). Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Can J Bot.* 31(6):578-580.
- Zamir, L.O., Gauthier, M.J., Devor, K.A., Nadeu, Y. and Sauriol, F.** (1989). Trichodiene is a precursor to trichothecenes. *J Chem Soc Chem Commun.* 9:598-600.
- Zamir, L.O., Devor, K.A., Nikolakakis, A. and Sauriol, F.** (1990). Biosynthesis of *Fusarium culmorum* trichothecenes. The roles of isotrichodermin and 12,13-epoxytrichothec-9-ene. *J Biol Chem.* 265(12):6713-25. Erratum in: *J Biol Chem.* 265(25):15347.
- Zamir, L.O., Devor, K.A. and Sauriol, F.** (1991). Biosynthesis of the trichothecene 3-acetyldeoxynivalenol. Identification of the oxygenation steps after isotrichodermin. *J Biol Chem.* 266(23):14992-5000.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S. and Xu, J.R.** (2000). The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 13(7):724-732.

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se han publicado 3 artículos en revistas científicas internacionales (además de otros 2 artículos ya indicados en la bibliografía: Tijerino *et al.*, 2011a y 2011b):

- Cardoza, R.E., Malmierca, M.G., Hermosa, M.R., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Proctor, R.H., Tijerino, A.M., Rumbero, A., Monte, E. and Gutiérrez, S.** (2011). Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthesis genes in filamentous fungi of the genus *Trichoderma*. *Appl Environ Microbiol.* 77(14):4867-4877.
- Malmierca, M.G., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Hermosa, R., Monte, E. and Gutiérrez, S.** (2012). Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Appl Environ Microbiol.* 78(14):4856-4868.
- Malmierca, M.G., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Collado, I.G., Hermosa, R., Monte, E. and Gutiérrez, S.** (2013). Relevance of trichothecenes in fungal physiology: Disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genet Biol.* (en prensa). doi: 10.1016/j.fgb.2013.02.001.



Detalle de la vidriera de la Facultad de CC. Biológicas y Ambientales