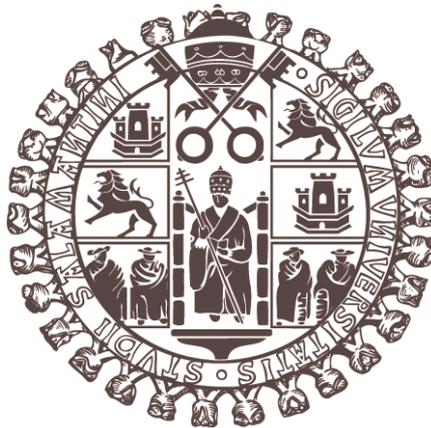


Universidad de Salamanca

Departamento de Microbiología y Genética

Centro Hispanoluso de Investigaciones Agrarias



**"IDENTIFICACIÓN DE GENES INDUCIDOS EN LA CEPA DE
BIOCONTROL *Trichoderma harzianum* CECT 2413 DURANTE
LA INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE.
CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICO-FUNCIONAL DE LOS
GENES *qid74* y *asp1*"**

Ilanit Samolski Klein

2014



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



Universidad de Salamanca
Departamento de Microbiología y Genética
Centro Hispanoluso de Investigaciones Agrarias

**"IDENTIFICACIÓN DE GENES INDUCIDOS EN LA CEPA
DE BIOCONTROL *Trichoderma harzianum* CECT 2413
DURANTE LA INTERACCIÓN CON PLANTAS DE
TOMATE. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICO-FUNCIONAL
DE LOS GENES *qid74* y *asp1*"**

**Memoria presentada por Ilanit Samolski Klein para optar al
Grado de Doctor en Biología**

Salamanca, 15 de septiembre de 2014

Enrique Monte Vázquez, Catedrático de Microbiología en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y **M. Belén Suárez Fernández**, Profesora Ayudante Doctor del mismo Departamento,

CERTIFICAMOS:

Que la memoria titulada "**Identificación de genes inducidos en la cepa de biocontrol *Trichoderma harzianum* CECT 2413 durante la interacción con plantas de tomate. Caracterización biológico-funcional de los genes *qid74* y *asp1***", presentada por Ilanit Samolski Klein para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos este certificado en Salamanca a 15 de septiembre de 2014.

Fdo: Enrique Monte Vázquez

Fdo: M. Belén Suárez Fernández

Luis R. Fernández Lago, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "**Identificación de genes inducidos en la cepa de biocontrol *Trichoderma harzianum* CECT 2413 durante la interacción con plantas de tomate. Caracterización biológico-funcional de los genes *qid74* y *asp1***", presentada por Ilanit Samolski Klein para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. Enrique Monte Vázquez y M. Belén Suárez Fernández, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo este certificado en Salamanca a 15 de septiembre de 2014.

Fdo: Luis R. Fernández Lago

"Para mí, la ciencia son las gafas que nos permiten escudriñar la estructura del universo, descubrir el mundo microscópico, explorar el interior del cerebro humano, comprender nuestro comportamiento, y disfrutar de toda la complejidad y esplendor que oculta la naturaleza. Sin la ciencia, ni siquiera seríamos conscientes de la existencia de tales tesoros."

(Pere Estupinyà, *El ladrón de cerebros*)

"...nada está perdido si se tiene por fin el valor de proclamar que todo está perdido y que hay que empezar de nuevo..."

(Julio Cortázar, *Rayuela*)

Índice

ANTECEDENTES	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1. El género <i>Trichoderma</i>	9
1.1. Diversidad ecológica	9
1.2. Diversidad taxonómica	11
2. Aplicaciones del género <i>Trichoderma</i>	13
3. <i>Trichoderma</i> spp. como agentes de control biológico (ACBs)	13
3.1. Micoparasitismo	14
3.2. Antibiosis	16
3.3. Competición con el patógeno	17
3.4. Inducción de mecanismos de defensa en las plantas	17
3.5. Promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas	21
4. Simbiosis multifuncional <i>Trichoderma</i> -planta	22
4.1. Establecimiento de la asociación simbiótica <i>Trichoderma</i> -planta	22
4.2. Protección de las plantas frente a estreses abióticos y promoción del uso eficiente del nitrógeno	23
5. "ÓMICAS" EN <i>Trichoderma</i> spp.	25
OBJETIVOS	29
CAPÍTULO I: DISEÑO DE UN MICROARRAY DE ALTA DENSIDAD DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN ESPECIES DE <i>Trichoderma</i>: "Trichochip v. 1.0". IDENTIFICACIÓN DE GENES INDUCIDOS EN <i>T. harzianum</i> DURANTE LA INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE	
INTRODUCCIÓN	35
RESULTADOS	
1. Diseño y composición de un <i>microarray</i> de oligonucleótidos para especies del género <i>Trichoderma</i> : "Trichochip v. 1.0"	39

2. Respuesta transcriptómica de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 en distintas condiciones de cultivo	41
2.1. Control de calidad y cálculo de la señal por <i>set</i> de sondas (gen) y por <i>microarray</i> (muestra)	41
2.2. Cálculo de la expresión diferencial significativa	42
3. Identificación de genes inducidos en <i>T. harzianum</i> CECT 2413 durante la interacción con plantas de tomate	47
<i>DISCUSIÓN</i>	54

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *qid74* DE *T. harzianum* CECT 2413

<i>INTRODUCCIÓN</i>	65
<i>RESULTADOS</i>	68
1. Ensayos de hidrofobicidad	68
2. Ensayos de protección celular: resistencia a compuestos antifúngicos	69
3. Estudio de la implicación del gen <i>qid74</i> en la interacción <i>Trichoderma</i> -planta	72
3.1. Análisis de expresión del gen <i>qid74</i>	72
3.2. Competencia rizosférica	74
3.2.1. Obtención de cepas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 marcadas con proteína verde fluorescente (GFP)	75
3.2.2. Adherencia y colonización	76
3.3. Efecto sobre la germinación de semillas, crecimiento y estatus nutricional de las plantas	79
3.3.1. Ensayos en fitotrón	79
3.3.2. Ensayos en invernadero	83
<i>DISCUSIÓN</i>	86

CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *asp1* DE *T. harzianum* CECT 2413

<i>INTRODUCCIÓN</i>	95
<i>RESULTADOS</i>	99

1.	Obtención y caracterización inicial de cepas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 que sobreexpresan el gen <i>asp1</i>	99
1.1.	Obtención y verificación genotípica de los transformantes	99
1.2.	Análisis de expresión a nivel de ARNm y de proteína	101
1.3.	Análisis de actividad proteolítica	102
1.4.	Ensayos de crecimiento en placa	103
2.	Obtención y caracterización inicial de cepas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 que silencian el gen <i>asp1</i>	103
2.1.	Obtención y verificación genotípica de los transformantes	104
2.2.	Análisis de expresión a nivel de ARNm y de proteína	106
2.3.	Análisis de actividad proteolítica	108
2.4.	Ensayos de crecimiento en placa	109
3.	Regulación de la actividad enzimática de ASP1: temperatura y pH	109
3.1.	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la peptidasa ASP1	110
3.2.	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la peptidasa ASP1	111
4.	Ensayos de actividad antifúngica de <i>T. harzianum</i>	112
4.1.	Ensayos <i>in vitro</i>	112
4.2.	Ensayos <i>in vivo</i>	113
5.	Ensayos de protección celular: resistencia a compuestos antifúngicos	114
6.	Estudio de la implicación del gen <i>asp1</i> en la interacción <i>Trichoderma</i>-planta	115
6.1.	Análisis de expresión del gen <i>asp1</i>	115
6.2.	Competencia rizosférica	117
6.3.	Efecto sobre la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas	118
6.4.	Inducción de respuestas de defensa en plantas	120
	6.4.1. A nivel local	120
	6.4.2. A nivel sistémico	122
	<i>DISCUSIÓN</i>	126
	<i>CONCLUSIONES</i>	135
	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	139
1.	Microorganismos: cepas, mantenimiento y conservación	141
1.1.	<i>Escherichia coli</i>	141
1.2.	Hongos filamentosos y oomicetos	141

2.	Plantas: variedades y condiciones generales de crecimiento	143
3.	Medios de cultivo	143
3.1.	Medios de cultivo para bacterias	143
3.2.	Medios de cultivo para hongos	144
3.3.	Medios de cultivo para plantas	144
4.	Técnicas generales de manipulación de hongos filamentosos	145
4.1.	Obtención de esporas fúngicas	145
4.2.	Cultivos monospóricos de <i>T. harzianum</i>	145
4.3.	Obtención de germínulas de <i>T. harzianum</i>	146
4.4.	Cultivos de <i>T. harzianum</i> para la extracción de ADN	146
4.5.	Cultivos de <i>T. harzianum</i> para la extracción de ARN	146
4.6.	Cultivos de <i>T. harzianum</i> para la obtención de proteínas extracelulares	147
4.7.	Obtención de paredes celulares fúngicas	147
5.	Técnicas generales de manipulación de plantas	147
5.1.	Esterilización superficial de semillas	147
5.2.	Cultivo de plantas en turba	147
5.3.	Cultivo de plantas de tomate en medio semisólido MS	148
5.4.	Cultivo de plantas de pepino en medio líquido PGM: cultivos hidropónicos	148
5.5.	Obtención de paredes celulares vegetales	149
6.	Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos	149
6.1.	Vectores de clonación	149
6.2.	Oligonucleótidos	149
6.3.	Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	155
6.3.1.	A pequeña escala: "boiling minipreps"	155
6.3.2.	Lisis alcalina a pequeña escala	155
6.3.3.	Lisis alcalina a gran escala	155
6.4.	Extracción de ADN genómico	156
6.4.1.	Extracción rápida de ADN de <i>Trichoderma</i> spp. a pequeña escala	156
6.4.2.	Extracción de ADN de <i>Trichoderma</i> spp. a gran escala	156
6.4.3.	Extracción de ADN de plantas a pequeña escala	157
6.5.	Extracción de ARN	158
6.5.1.	Extracción de ARN total de <i>Trichoderma</i> spp.	158
6.5.2.	Extracción de ARN total de plantas	159
6.6.	Síntesis de ADNc a partir de ARN vegetal	159

6.7.	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	159
6.7.1.	Electroforesis de ADN	159
6.7.2.	Electroforesis de ARN	160
6.7.2.1.	En condiciones no desnaturalizantes	160
6.7.2.2.	En condiciones desnaturalizantes	160
6.8.	Cuantificación de ácidos nucleicos	161
6.8.1.	Mediante espectrofotometría	161
6.8.2.	Mediante electroforesis	161
6.8.3.	En placa Petri con BrEt	161
6.9.	Purificación de fragmentos de ADN	162
6.10.	Manipulación enzimática de ácidos nucleicos	162
6.10.1.	Digestión de ADN con enzimas de restricción	
6.10.2.	Desfosforilación de ADN plasmídico	162
6.10.3.	Ligación	162
6.11.	Amplificación de ADN: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	163
6.11.1.	PCR a tiempo final	163
6.11.1.1.	PCR de rutina	163
6.11.1.2.	PCR de alta fidelidad	163
6.11.1.3.	PCR de fragmentos largos	163
6.11.1.4.	PCR de colonia	163
6.11.2.	PCR a tiempo real (PCR cuantitativa)	163
6.12.	Secuenciación de ADN	165
6.13.	Análisis de hibridación de ácidos nucleicos en membranas	165
6.13.1.	Transferencia de ácidos nucleicos a membranas	165
6.13.1.1.	Transferencia de ADN (<i>Southern blot</i>)	165
6.13.1.2.	Transferencia de ARN (<i>Northern blot</i>)	166
6.13.2.	Marcaje e hibridación con sondas de ADN no radiactivas	166
6.13.3.	Marcaje e hibridación con sondas de ADN radiactivas	167
6.13.4.	Reutilización de membranas	168
6.14.	Métodos de transformación de microorganismos	169
6.14.1.	Obtención de células competentes y transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	169
6.14.2.	Obtención y transformación de protoplastos de <i>T.</i> <i>harzianum</i>	169
7.	"Trichochip v. 1.0"	171
7.1.	Secuencias de partida	171
7.2.	Diseño y selección de sondas	171

7.3.	Fabricación del <i>microarray</i>	172
7.4.	Preparación de muestras para la hibridación	172
7.5.	Análisis bioinformático y estadístico de los datos obtenidos	173
8.	Técnicas generales de manipulación de proteínas	173
8.1.	Precipitación y diálisis de proteínas extracelulares de <i>Trichoderma</i> spp.	173
8.2.	Cuantificación de proteínas	174
8.3.	Electroforesis 1-D en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	174
8.4.	Tinción con azul de Coomassie	175
8.5.	Transferencia de proteínas a membranas e inmunodetección (<i>Western blot</i>)	175
8.6.	Reutilización de membranas	176
8.7.	Obtención del anticuerpo policlonal anti-ASP1	176
8.8.	Electroelución de proteínas a partir de geles de poliacrilamida	176
8.9.	Ensayos de actividad proteolítica	177
9.	Obtención de transformantes de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	178
9.1.	Construcción del plásmido pJL43b1- <i>asp1</i>	179
9.2.	Construcción del plásmido pSIL- <i>asp1</i>	179
10.	Ensayos para la caracterización funcional de los genes <i>qid74</i> y <i>asp1</i> de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	182
10.1.	Ensayos de hidrofobicidad	182
10.1.1.	Hidrofobicidad superficial	182
10.1.2.	Ruptura de la interfase líquido-aire	182
10.2.	Ensayos de resistencia a compuestos antifúngicos	182
10.2.1.	Resistencia a enzimas líticas: autoprotección celular	182
10.2.2.	Resistencia a compuestos tóxicos secretados por la planta	183
10.2.3.	Resistencia a fungicidas químicos	183
10.3.	Ensayos de crecimiento en medio sólido	183
10.4.	Ensayos de actividad antifúngica de <i>T. harzianum</i>	183
10.4.1.	Ensayos <i>in vivo</i> : enfrentamiento en medio sólido	183
10.4.2.	Ensayos <i>in vitro</i> : inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en medio líquido	184
10.5.	Ensayos de interacción <i>Trichoderma</i> -planta	184
10.5.1.	Semillas pildoradas con esporas de <i>T. harzianum</i>	184
10.5.2.	Cultivos de <i>Trichoderma</i> -planta en medio semisólido MS	184
10.5.3.	Cultivos de <i>Trichoderma</i> -planta en medio líquido PGM	185
10.5.3.1.	Con micelio de <i>T. harzianum</i>	185

10.5.3.2.	Con germínulas de <i>T. harzianum</i>	185
10.5.4.	Análisis de germinación de semillas y crecimiento de plantas de tomate y pepino	185
10.5.5.	Cuantificación de nutrientes en hojas de pepino y tomate	186
10.5.6.	Adherencia y colonización de raíces en plántulas de pepino	186
10.5.7.	Inducción de respuestas de defensa en plantas a nivel local y sistémico	186
10.5.7.1.	Acumulación de fitoalexinas (autofluorescencia) y fitotoxicidad a nivel local	186
10.5.7.2.	Expresión de genes de defensa en planta	187
10.5.7.2.1.	<i>In vitro</i>	187
10.5.7.2.2.	<i>In vivo</i>	188
11.	Microscopía confocal de fluorescencia	188
12.	Herramientas bioinformáticas y estadísticas	188
12.1.	Análisis de secuencias de ADN y proteínas	188
12.2.	Análisis estadístico de datos	189
 <i>BIBLIOGRAFÍA</i>		 191
 <i>SIGLAS Y ABREVIATURAS</i>		 213

Antecedentes

La crisis mundial del precio de los alimentos, seguida de la crisis financiera y la recesión económica de los últimos años, ha elevado el número de personas malnutridas en el mundo a niveles sin precedentes (FAO, 2011). Con un pronóstico global que supera los 9.000 millones de habitantes para el 2050 y después de que la ONU estableciera la disminución de la pobreza, del hambre y la degradación del medio ambiente como parte de los objetivos de desarrollo del milenio, la agricultura del siglo XXI se enfrenta a un gran reto: la implementación de estrategias de producción sostenible y de bajo impacto ambiental que permitan generar suficientes alimentos, energías renovables y materias primas.

Dado el inminente crecimiento poblacional, se ha calculado que la producción agrícola necesitaría incrementarse en un 70% para garantizar seguridad alimentaria (FAO, 2009), esto sin tener en cuenta que el progreso de la producción de biocombustibles también supone una mayor demanda de productos agrícolas. En este contexto, con el fin de satisfacer los nuevos requerimientos de alimentos y energéticos, la producción actual debería intensificarse más que expandirse. De lo contrario, puesto que la superficie para uso agrícola es limitada, la transformación de áreas naturales en terrenos cultivables pondría en riesgo la biodiversidad de los ecosistemas (Morrissey y col., 2004).

Tras la denominada "revolución verde" de la década de los 60, la aplicación de fertilizantes y pesticidas químicos para incrementar la productividad de los cultivos por unidad de superficie ha venido creciendo de forma exponencial (Galloway, 2005). Aunque hoy en día es innegable que el uso indiscriminado de productos químicos en las prácticas agrícolas genera efectos inaceptables para la salud humana y el medio ambiente (Cowling y col., 2001; UNESCO, 2007), a medida que la agricultura se ha ido intensificando los sistemas productivos se han vuelto más dependientes del uso de agroquímicos destinados a mantener la calidad y la productividad de los cultivos.

Afortunadamente, una serie de factores confluente fuerzan a buscar alternativas a los agroquímicos. Por un lado, los organismos fitopatógenos emergentes, re-emergentes y endémicos siguen desafiando nuestra capacidad para proteger los cultivos y mantener la estabilidad de los ecosistemas (Miller y col., 2009). Es más, cada vez son más frecuentes los casos de patógenos que presentan resistencia adquirida a los pesticidas químicos disponibles en el mercado (Harman y col., 2010). Por otro lado, situaciones como el cambio climático y la crisis energética han puesto de manifiesto la vulnerabilidad de los mercados agrícolas. Teniendo en cuenta que la industria de los

agroquímicos depende de la energía fósil, el incremento en el precio del crudo ha repercutido directamente en sus costes de fabricación. Además, la creciente preocupación sobre la polución química, la degradación del medio ambiente y los restos de pesticidas en los alimentos se ha traducido en una progresiva demanda de los llamados alimentos orgánicos, biológicos o ecológicos por parte del consumidor (Thakore, 2006).

Actualmente existen regulaciones estrictas sobre el uso de pesticidas químicos, así como una fuerte presión política para la eliminación de los productos más tóxicos existentes en el mercado. Al mismo tiempo, diferentes organizaciones mundiales inciden en la importancia de optimizar la eficiencia en el uso de fertilizantes para evitar pérdidas y minimizar los impactos negativos de la utilización de abonos y pesticidas químicos. Con este fin, se han planteado una serie de directrices para la reforma de políticas que aseguren las buenas prácticas agrícolas, en las que se reconsiderará en qué medida el uso de estos productos está realmente justificada (FAO, 2010). Se aconsejan aproximaciones holísticas como la implementación de programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (MIP, IPM en inglés). Estos programas combinan diferentes estrategias –biológicas, culturales, físicas y químicas– con objeto de reducir la dependencia a los pesticidas químicos y promover el crecimiento de cultivos sanos, sin perder de vista la importancia de los procesos biológicos que se dan en el suelo, así como la conservación de la biodiversidad para aumentar la productividad.

La mayor demanda de alternativas sostenibles que mejoren la productividad agrícola, preservando la biodiversidad, ha impulsado la investigación y desarrollo de nuevos productos eficaces, seguros y respetuosos con el medio ambiente. Dentro de las nuevas perspectivas que ofrece la biotecnología agrícola se encuentra el uso controlado de microorganismos. Los efectos beneficiosos de ciertos microorganismos sobre los cultivos se pueden aprovechar para desarrollar bioinoculantes que permitan promover el crecimiento de las plantas, protegerlas frente al ataque de fitopatógenos y reducir el estrés generado por factores bióticos, abióticos y fisiológicos (Berg, 2009). En este sentido, una explotación racional de la interacción planta-microorganismo podría ayudar a transformar la agricultura. El aprovechamiento de las capacidades naturales de los microorganismos para mitigar el daño generado por distintos tipos de estreses, así como para promover el crecimiento de plantas e incrementar los rendimientos de los cultivos, ofrece la oportunidad de mantener la biodiversidad y de proteger la salud humana y el medioambiente. De hecho, la creciente demanda de bioinoculantes se ha

reflejado en una rápida expansión del mercado mundial de biopesticidas, con un 16,1% de tasa de crecimiento anual estimada para el periodo 2012-2017 (Bolckmans, 2008; Lehr, 2012).

El uso de microorganismos beneficiosos presenta una serie de ventajas sobre la utilización de fertilizantes y pesticidas químicos convencionales: son más seguros, debido a su limitada toxicidad; son efectivos a bajas dosis, lo que implica una menor exposición al producto; no se acumulan en la cadena alimentaria ya que su rápida descomposición supone una disminución de residuos edáficos, acuíferos y atmosféricos; no eliminan organismos beneficiosos del suelo, ya que presentan una actividad antagonista más específica; no promueven el desarrollo de resistencia en los patógenos; y su producción es más barata y estable ante los cambios de precio de los combustibles fósiles (Thakore, 2006; Berg, 2009).

Se sabe que los mecanismos por los que las interacciones planta-microorganismo favorecen la productividad agrícola son múltiples (Avis y col., 2008), y que dependiendo del modo de acción del microorganismo utilizado para la formulación del producto, estos pueden funcionar como biocidas, fertilizantes, fitoestimulantes y/o vigorizantes. No obstante, para alcanzar una intensificación sostenible de la producción agrícola y, a su vez, poder mitigar los efectos del cambio climático sobre los cultivos, es necesario un mayor entendimiento de los procesos biológicos involucrados en las prácticas agrícolas. La incorporación de principios científicos derivados de la investigación interdisciplinar y de la aplicación de las nuevas aproximaciones tecnológicas conocidas como "ómicas" promete el desarrollo de formulaciones microbianas con efectos más predecibles y constantes sobre la producción de los cultivos (Glare y col., 2012). La identificación de los diferentes mecanismos que rigen las interacciones planta-microorganismo facilitará la selección de cepas microbianas que combinen diversos atributos para conseguir un mayor espectro de acción. Resulta prioritaria la disponibilidad de cepas que puedan incluirse en programas MIP, así como cepas de control biológico que sean tolerantes a pesticidas químicos, o que favorezcan un aprovechamiento eficiente de los fertilizantes químicos por parte de la planta para poder reducir el uso de los mismos (Adesemoye y Kloepper, 2009; Adesemoye y col., 2009). Tampoco debe descuidarse el estudio de los procesos de producción de biomasa microbiana, formulación y aplicación del producto e interacciones entre distintas cepas, teniendo en cuenta la importancia de desarrollar

una adecuada mercadotecnia y la necesidad de crear una conciencia ambiental en los agricultores y consumidores finales (Kamilova y Bruyne, 2013; Walters y col., 2013).

Existe una gran diversidad de microorganismos cuyos efectos beneficiosos sobre las plantas están siendo explotados a nivel agrícola mediante la aplicación de bioinoculantes (Avis y col., 2008; Berg, 2009). Entre ellos se encuentran los fertilizantes pertenecientes a especies bacterianas de los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*; así como hongos micorrízicos de los géneros *Glomus* o *Laccaria*. Entre los agentes de control biológico destacan bacterias como *Bacillus thuringiensis* y hongos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, por su capacidad bioinsecticida; hongos de los géneros *Arthrobotrys* y *Dactylella*, como bionematicidas; y hongos de los géneros *Cryphonectria*, *Phanerochaete*, *Coniothyrium*, *Clonostachys* y *Trichoderma*, como biofungicidas.

En el caso de *Trichoderma* spp., además de su capacidad de actuar como biofungicidas, pueden actuar como bioestimulantes y biofertilizantes. Así, debido a sus múltiples efectos beneficiosos sobre los cultivos, ya sea en presencia o en ausencia de patógenos, el uso de productos comerciales basados en especies fúngicas pertenecientes al género *Trichoderma* constituye una alternativa prometedora que cada vez está recibiendo mayor atención en agricultura (Verma y col., 2007; Saba y col., 2012). Tanto es así que más del 60% de los biopesticidas basados en especies fúngicas registrados en el mercado están formulados a base de *Trichoderma* spp. (Harman y col., 2010).

Introducción General

1. EL GÉNERO *Trichoderma*

El género *Trichoderma* comprende, en su mayoría, especies de hongos capaces de desarrollarse rápidamente sobre sustratos muy diversos y de producir abundantes conidios (esporas asexuales) de color verde (**Figura 1A**). El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. Los conidióforos se ramifican siguiendo un patrón repetitivo con aspecto piramidal, y terminan en una o más fiálides (**Figura 1B**). Los conidios, producidos a partir de los conidióforos, son generalmente elípticos, de paredes lisas y uninucleados (**Figura 1C**). Bajo ciertas condiciones de estrés también se pueden formar estructuras asexuales de resistencia denominadas clamidosporas. Estas se forman en el micelio, son globosas, con pared gruesa y rugosa, y tienen gran importancia para la supervivencia del hongo (Gams y Bissett, 1998). El número de cromosomas por núcleo y el tamaño total del genoma varía según la especie, habiéndose descrito la presencia de 2 a 7 cromosomas (Lorito y col., 2010). A partir de los genomas de las distintas especies de *Trichoderma* secuenciadas hasta el momento (ver apartado 4 de esta Introducción), se ha determinado un tamaño de 31,7 a 40,98 Mpb (Mukherjee y col., 2013; Xie y col., 2014).

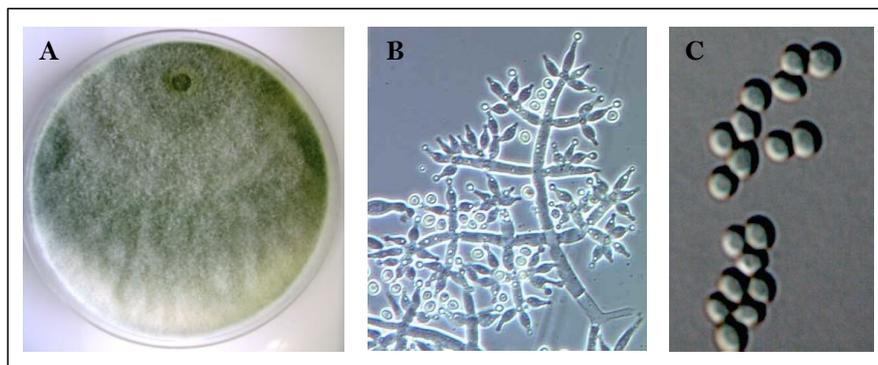


Figura 1. Morfología de *Trichoderma harzianum*. A: Aspecto de una colonia de *T. harzianum* CECT 2413 en medio PDA. B: Conidióforos ramificados (tomada de Samuels y col., 2011). C: Conidios observados al microscopio óptico (400x).

1.1. Diversidad ecológica

Trichoderma es un género fúngico cosmopolita. Su amplia distribución permite hallar especies en todas las latitudes y bajo diferentes condiciones climatológicas (Samuels, 2006). Su habilidad para utilizar múltiples sustratos y sus distintas formas de vida ponen de manifiesto su naturaleza oportunista y su versatilidad para adaptarse a

distintas condiciones ecológicas (Harman y col., 2004; Druzhinina y col., 2011, 2012; Chaverri y Samuels, 2013). Aunque comúnmente se consideran hongos del suelo, por encontrarse de manera habitual tanto en suelos agrícolas, forestales o en pastizales, se han aislado especies en hábitats y nichos muy diversos.

Entre los hongos saprófitos más comúnmente aislados figuran especies del género *Trichoderma* que, al alimentarse de residuos vegetales como madera, cortezas y hojarasca, participan en la descomposición de materia orgánica en el suelo. El género también comprende especies que se comportan como biotrofas ya que pueden establecer asociaciones simbióticas, tanto de parasitismo como de mutualismo. Como parásitos, pueden vivir a expensas de otros hongos (micoparásitos) debido a su capacidad micotrófica. El parasitismo alcanza especial relevancia en agricultura cuando la presa parasitada es un organismo fitopatógeno, puesto que contribuye al control de las enfermedades de las plantas. Como mutualistas, las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de comportarse como simbioses oportunistas avirulentos de las plantas (Harman y col., 2004). La asociación simbiótica *Trichoderma*-planta se puede establecer a nivel del sistema radical (especies rizocompetentes) así como con la parte aérea y, dependiendo de la cepa, puede ser a nivel superficial o a nivel endofítico (Yedidia y col., 1999; Bailey y col., 2008, 2009). De este modo, las especies de *Trichoderma* reciben nutrientes exudados por las plantas y un nicho seguro para colonizar, mientras que la planta recibe protección frente a estreses bióticos y abióticos, a la vez que se ve favorecida en su crecimiento y desarrollo. Teniendo en cuenta los diferentes estilos de vida del género *Trichoderma*, la rizosfera representa un nicho ideal para especies rizocompetentes ya que en ella se pueden alimentar de otros hongos –vivos o muertos–, aprovechar los nutrientes exudados por las raíces vegetales y asociarse con las mismas, brindando así oportunidades para los dos tipos generales de estrategias nutricionales generales mencionadas (biotrofismo y saprofitismo). Cabe indicar que, si se considera que muchas especies de *Trichoderma* también pueden alimentarse de restos de otros hongos, lo más apropiado sería definir el estilo de vida del género como micotrófico más que micoparasítico por ser el primero un término que incluye ambas estrategias nutricionales (Druzhinina y col., 2011).

Avances recientes en ecología molecular y genómica comparada apuntan al micoparasitismo como la forma de vida ancestral de *Trichoderma* spp. (Kubicek y col., 2011). Se ha propuesto que los atributos relacionados con la micotrofia (como el gran arsenal de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios típicos del micoparasitismo)

junto con un amplio oportunismo ambiental, habrían llevado a ciertas especies de este género a cambiar su forma de vida con el fin de habitar nichos ecológicos alternativos, favoreciendo consecuentemente la evolución de su interacción con animales y plantas (Druzhinina y col., 2011; Chaverri y Samuels, 2013). Por ejemplo, en el caso de la interacción beneficiosa *Trichoderma*-planta, el micoparásito habría llegado a la rizosfera atraído por la presencia de presas fúngicas potenciales, así como por los nutrientes exudados por las raíces, y posteriormente habría terminado por colonizar el sistema radical, convirtiéndose en una especie mutualista. En la misma línea estarían otras especies que, atraídas por la presencia de hongos micorrízicos, distribuidos sobre la superficie externa de las raíces, se habrían valido del micelio de estos hongos con el fin de penetrar dentro de las mismas, convirtiéndose así en especies endófitas. Del mismo modo, especies como *T. harzianum* habrían pasado de parasitar únicamente a otros hongos a parasitar también huevos de nematodos, convirtiéndose así en especies nematófagas. En el caso de *T. longibrachiatum* habría llegado a causar micosis invasivas en pacientes inmunodeprimidos gracias a su oportunismo y resistencia a agentes antifúngicos (Kredics y col., 2003). Esta resistencia podría haber sido adquirida como un resultado adaptativo a los metabolitos de defensa producidos por sus presas durante el ataque micoparasítico. Otro ejemplo lo representan las especies saprófitas, como *T. reesei*, que habrían pasado de alimentarse de otros hongos a alimentarse de la madera en donde originalmente encontraban y atacaban a sus presas. La hipótesis de que las formas de vida de *T. reesei*, *T. longibrachiatum* y ciertas especies endofíticas sean relativamente recientes dentro del género *Trichoderma* se ve respaldada por la ubicación de estas especies en posiciones aisladas y terminales de los árboles filogenéticos (Druzhinina y col., 2011).

1.2. Diversidad taxonómica

El género *Trichoderma* agrupa especies de hongos filamentosos anamórficos (mitóticos) tradicionalmente clasificados de forma artificial dentro de la División Deuteromicota por carecer de reproducción sexual (estado teleomórfico o meiótico). Su ciclo de reproducción asexual alterna entre micelio y conidios producidos a partir de células desnudas sin la envoltura adicional de un cuerpo fructífero, agrupándose así dentro de la Clase de los Hifomicetos. La relación anamorfo-teleomorfo entre los géneros *Trichoderma* e *Hypocrea* fue reconocida hace aproximadamente 150 años a nivel morfológico pero se confirmó a nivel molecular hace solo 19 años (Rehner y Samuels,

1995). Diversos trabajos han demostrado que las especies de *Trichoderma* son derivados clonales del género *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual (Kuhls y col., 1996; Chaverri y col., 2001; Chaverri y Samuels, 2002). Actualmente, el género *Trichoderma* se clasifica dentro de la División Ascomycota, caracterizada por presentar ciclo sexual y reproducción mediante ascosporas (esporas sexuales). Dado que las últimas disposiciones del Código Internacional de Nomenclatura Botánica para algas, hongos y plantas (CINB) estipulan que únicamente debe utilizarse un nombre científico para cada especie fúngica, se ha recomendado que el uso del nombre *Hypocrea* sea discontinuado en favor de *Trichoderma* (Rossman y col., 2013).

El género *Trichoderma* originalmente agrupaba diversas secciones siguiendo criterios morfológicos (Rifai, 1969; Bissett, 1991), que por lo general resultaban imprecisos e ineficaces para diferenciar especies o clasificar nuevos aislamientos dentro de los grupos establecidos. Actualmente, gracias al uso de técnicas moleculares, los diversos grupos taxonómicos se están definiendo de manera más precisa. Los estudios basados en la secuenciación de regiones de ADN han revelado que el ordenamiento inicial de especies dentro de secciones definidas morfológicamente no era correcto y que las especies individuales habían sido concebidas de manera muy amplia. A medida que más especies se han ido incluyendo en los análisis filogenéticos, las secciones originales han ido perdiendo su significado, se han encontrado nuevos grupos y el género se ha tornado más complejo. De este modo, la continua búsqueda de aislamientos fúngicos en nuevos ecosistemas somete a la sistemática de este género a constantes cambios, razón por la cual hoy en día no se dispone de ninguna subdivisión formal del género *Trichoderma* o *Hypocrea* (Samuels, 2006). En 2006, el género *Trichoderma* ya comprendía 100 especies (Druzhinina y col., 2006) y desde entonces el árbol filogenético ha seguido creciendo. La identificación fiable de nuevas especies se ha visto facilitada gracias al desarrollo de herramientas bioinformáticas como TrichOKEY y TrichoBLAST, disponibles en el sitio <http://www.isth.info> (Druzhinina y col., 2005; Kopchinskiy y col., 2005). Hoy en día, la Subcomisión Internacional de *Trichoderma/Hypocrea* enumera 104 especies definidas a nivel molecular (<http://www.isth.info/biodiversity/index.php>).

2. APLICACIONES DEL GÉNERO *Trichoderma*

Muchas especies del género *Trichoderma* poseen atributos que las convierten en organismos con gran potencial biotecnológico (Schuster y Schmoll, 2010). A nivel industrial destaca *T. reesei*, especie que se caracteriza por su gran habilidad para producir enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, que ha sido ampliamente utilizada en áreas tan diversas como la industria papelera, alimentaria, farmacéutica, textil, así como en la producción de biocombustibles de segunda generación (Seiboth y col., 2011). Además, su extraordinaria capacidad para secretar proteínas la convierte en una de las especies de hongos filamentosos más explotadas como "fábrica celular" para la producción de proteínas heterólogas (Nevalainen y Peterson, 2014). Por otra parte, también pueden ser utilizadas como coadyuvantes durante la utilización de especies vegetales como biofactorias (Ming y col., 2013).

Recientemente se ha demostrado la utilidad de *T. reesei* y de otras especies como *T. viride* y *T. asperellum* en el campo de la nanotecnología, para la biosíntesis de nanopartículas de oro y de plata (Mukherjee y col., 2008; Vahabi y col., 2011; Mishra y col., 2014).

Algunas especies de *Trichoderma*, como *T. harzianum*, resultan potencialmente útiles en la bioremediación de ambientes terrestres y acuáticos contaminados con distintos compuestos tóxicos como hidrocarburos de petróleo, pesticidas químicos, metales pesados y cianuro (Tripathi y col., 2013b).

Una de las aplicaciones por las que más interés despierta el género *Trichoderma* recae en el ámbito de la biotecnología agrícola. La habilidad de ciertas especies para controlar enfermedades de plantas así como para estimular su crecimiento y desarrollo explica el creciente uso de estos microorganismos en agricultura (Harman y col., 2010).

3. *Trichoderma* spp. COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO (ACBs)

El término control biológico o biocontrol fue definido por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos como: "*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*" (NAS, 1987). Según esta definición, que da cabida a las

técnicas de biología molecular aplicadas a la biotecnología, la obtención de cultivares genéticamente resistentes a una enfermedad también sería una forma de control biológico. Lo que denominamos actualmente control biológico en agricultura hace referencia, en líneas generales, "*al empleo de microorganismos vivos, o sus productos, con capacidad de reducir la población de organismos fitopatógenos y plagas agrícolas potenciales y, a su vez, de favorecer el crecimiento y rendimiento de los cultivos*".

El potencial de algunas especies de *Trichoderma* como ACBs fue descrito por primera vez hace ya más de 80 años (Weindling, 1932), y desde entonces se ha comprobado la capacidad de numerosas cepas para antagonizar una larga lista de organismos fitopatógenos, empleando para ello distintos mecanismos de acción. Estas cepas pueden proteger a los cultivos de enfermedades causadas por ascomicetos, basidiomicetos y oomicetos (Monte, 2001). También se ha demostrado que muchas de ellas resultan útiles para el control de nematodos (Siddiqui y col., 2001; Sharon y col., 2001) y, que incluso, algunas podrían servir para el desarrollo de nuevas estrategias para el control de plagas de áfidos (Battaglia y col., 2013). Además, gracias a la tolerancia que presentan algunas cepas de *Trichoderma* a diversos fungicidas químicos utilizados en el campo (Papavizas y Lewis, 1983; Mukherjee y col., 1999) y al efecto sinérgico de ambos tipos de tratamientos, es posible utilizar con éxito estos ACBs en programas MIP, con el fin de reducir la dosis de agroquímicos hasta niveles subletales.

Aunque el género *Trichoderma* comprende una gran cantidad de especies (apartado 1.2 de esta introducción), el estudio de las propiedades como ACBs se ha centrado en unas pocas, destacando *T. atroviride*, *T. virens*, *T. viride*, *T. hamatum* y *T. harzianum* (Benítez y col., 2004).

Se han descrito diferentes mecanismos mediante los cuales las especies de *Trichoderma* pueden actuar como ACBs y favorecer a los cultivos (Benítez y col., 2004; Harman y col., 2004). Las distintas estrategias, descritas a continuación, no son excluyentes entre sí y dependen tanto de la cepa de *Trichoderma* utilizada, de la planta, del patógeno diana, así como de las condiciones ambientales.

3.1. Micoparasitismo

El micoparasitismo se entiende como el ataque de un hongo a otro hongo para usarlo como alimento. Los eventos que conlleva el micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* spp. son complejos, ocurren de manera sucesiva y van desde la percepción de la presencia de la presa hasta su aniquilación (**Figura 2**). En primer lugar, antes de

que haya contacto físico, las cepas de *Trichoderma* perciben a su presa y comienzan a crecer hacia esta por tropismo (Chet y col., 1981). Este reconocimiento remoto se debe, al menos parcialmente, a la expresión secuencial de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los hongos atacados (CWDEs, *Cell Wall Degrading Enzymes*). Aunque las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden seguir distintos patrones de inducción de CWDEs, parece ser que siempre tiene lugar la producción constitutiva, aunque a bajos niveles, de una exoquitinasa (*nag1*). La difusión de esta enzima provoca la liberación de quitooligómeros de la pared celular de la presa y estos compuestos, a su vez, inducen en las cepas de *Trichoderma* la expresión de endoquitinasas (Brunner y col., 2003). Estas enzimas, tras su secreción, difunden e inician la degradación de la pared celular de la presa antes de que se haya establecido el contacto físico (Zeilinger y col. 1999; Viterbo y col., 2002a). Además de quitooligómeros también tiene lugar la liberación de péptidos que son capaces de fijarse a receptores acoplados a proteínas G – proteínas transductoras de señales que llevan información desde el exterior de la célula hacia el interior– ubicados en la superficie de las hifas de *Trichoderma* spp. Consecuentemente, se activa una cascada de señalización en la que participan proteínas G y proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) que conducen a la modulación de factores de transcripción. Estos factores incrementan la expresión de genes que codifican enzimas de biosíntesis de metabolitos secundarios y de CWDEs.

Una vez que los dos hongos han entrado en contacto, el micoparásito se adhiere a la superficie de su presa. El proceso de adherencia está mediado por proteínas que contienen motivos de unión a celulosa presentes en las hifas del micoparásito y por lectinas presentes en las hifas de la presa (Inbar y Chet, 1995). Posteriormente, el micoparásito se enrosca alrededor de la presa y forma estructuras especializadas tipo apresorios con las que produce orificios en las hifas permitiendo así su penetración al lumen de la presa (Inbar y col., 1996). Durante la interacción, el micoparásito secreta numerosas CWDEs como quitinasas, glucanasas y proteasas (Viterbo y col., 2002b), así como antibióticos que actúan sinérgicamente para lograr degradar la pared celular de la presa y digerir su contenido intracelular (Schirmböck y col. 1994; Lorito y col., 1996). Al mismo tiempo, la presa responde secretando metabolitos secundarios (Aliferis y Jabaji, 2010) y especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Papapostulou y Georgiou, 2010) que inducen respuestas de desintoxicación y de estrés en las cepas de *Trichoderma* (Seidl y col., 2009b; Ruocco y col., 2009).

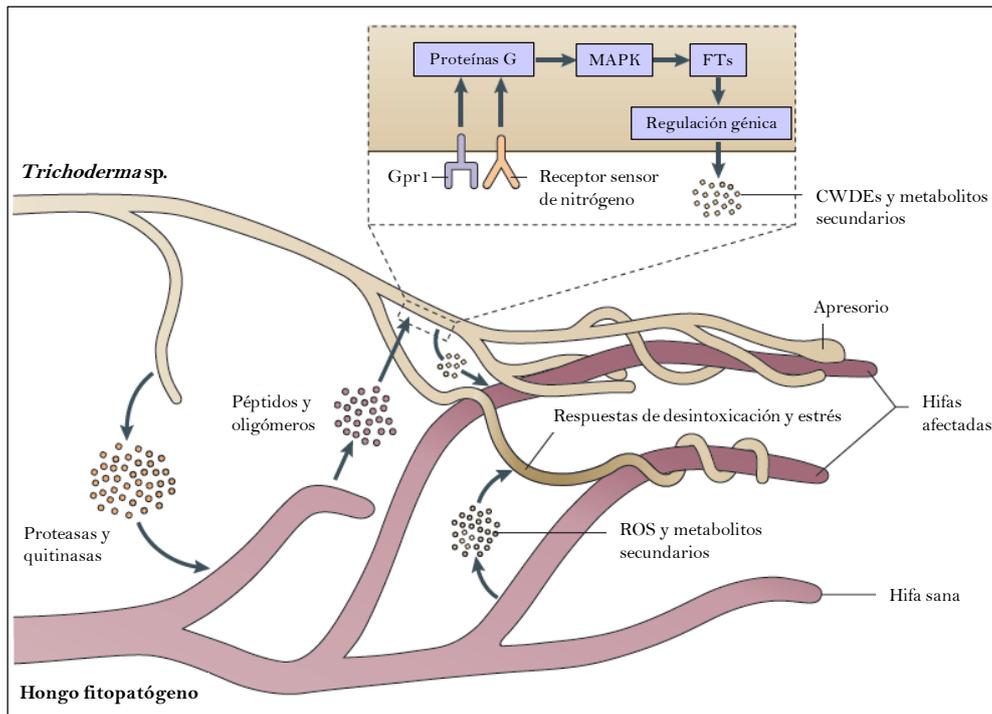


Figura 2. Representación esquemática del proceso micoparasítico llevado a cabo por especies de *Trichoderma* (Druzhinina y col., 2011). Gpr1, receptor acoplado a proteínas G; MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*; FTs, factores de transcripción; CWDE, *Cell Wall Degrading Enzymes*.

3.2. Antibiosis

La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por el producto metabólico de otro sin que el contacto físico entre ambos organismos sea estrictamente necesario. Según se mencionó anteriormente, hay cepas de *Trichoderma* que no solo disponen de enzimas con capacidad antagonista, sino de numerosos metabolitos secundarios con efecto antibiótico. La producción de antibióticos depende tanto de la cepa de *Trichoderma* como del organismo a antagonizar (Vinale y col., 2009). Por lo general, una cepa es capaz de producir varios tipos de antibióticos, lo que dificulta el poder relacionar la acción de un determinado metabolito con su actividad como ACB. Entre los más representativos del género se encuentran las pironas, terpenos (ej. trichotecenos), poliquétidos y péptidos no ribosómicos (ej. gliotoxina, gliovirina y peptaiboles) (Mukherjee y col., 2012).

La distinta naturaleza química que presentan estos antibióticos sugiere dos mecanismos de acción (Vinale y col., 2008). Por un lado, los metabolitos de bajo peso molecular, no polares y volátiles, como la 6-pentil- α -pirona (6PP), son producidos a altas concentraciones en el suelo, e implican un rango de acción a larga distancia sobre

la comunidad microbiana que habita en la rizosfera. Por otro lado, se consigue un efecto a corta distancia por la acción de antibióticos polares, como los peptaiboles, que actúan en la proximidad del sitio de producción, basando su efecto antibiótico en la inducción de apoptosis (Shi y col., 2012). El mencionado sinergismo existente entre las CWDEs y los antibióticos está estrechamente relacionado con su mecanismo de acción (Lorito y col., 1996).

3.3. Competición con el patógeno

La colonización exitosa de un hábitat determinado por parte de un organismo depende de su potencial para defender su nicho ecológico y prosperar, a pesar de la competición por los recursos (nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz, etc.) con otros organismos. Existen especies del género *Trichoderma* que son verdaderos ases en esta contienda, gracias a su rápido crecimiento y a su capacidad para hidrolizar diversos sustratos (Harman, 2006). La ubicuidad de las especies de *Trichoderma* en el suelo es una prueba de que son buenas competidoras por el espacio y por los recursos nutritivos. Se han documentado numerosos casos en los que se alude a la competencia como responsable directo del efecto antagonista de estos hongos. No obstante, aún no se ha determinado si estas especies son capaces de ejercer su acción antagonista solo a través de la competición o si, por el contrario, otros mecanismos, como el micoparasitismo o la antibiosis, preparan el terreno para que la competición se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman, 2000).

3.4. Inducción de mecanismos de defensa en las plantas

La capacidad de distintas cepas de *Trichoderma* para actuar como ACBs fue atribuida durante mucho tiempo al efecto directo que estas ejercían en los organismos fitopatógenos que viven en el suelo mediante el uso combinado de los mecanismos anteriormente mencionados. Sin embargo, hoy en día se sabe que los efectos beneficiosos de estos ACBs sobre las plantas no se limitan a sus propiedades antagonicas, y que además de los efectos directos que ejercen sobre la estructura y actividad de microorganismos fitopatógenos y nematodos, estos ACBs pueden también interactuar de manera íntima con las plantas y estimular sus mecanismos de defensa, así como su crecimiento y desarrollo (Harman y col., 2004; Shores y col., 2010), dialogando molecularmente con ellas. Durante la asociación directa *Trichoderma*-planta se produce una reprogramación de la expresión génica de la planta que conduce a la

estimulación de sus sistemas de defensa, capacitándola para ejercer una respuesta mayor y más rápida ante el ataque de organismos fitopatógenos.

Como parte de la respuesta inmune, las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa que se inducen tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos o beneficiosos (PAMPs/MAMPs, *pathogen/microbe-associated molecular patterns*) con el fin de protegerse de un potencial ataque (Jones y Dangl, 2006). Las moléculas endógenas liberadas por acción de dichos microorganismos, tales como oligómeros de la pared celular o fragmentos cuticulares, son también reconocidos por la planta como patrones asociados al peligro (DAMPs, *danger-associated molecular patterns*) (Dodds y Rathjen, 2010). Dichos patrones moleculares son capaces de desencadenar en las plantas la activación de distintas rutas de señalización mediadas por fitohormonas, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el ácido abscísico (ABA) y el etileno (ET) (Pieterse y col., 2009). Una vez que estas rutas son activadas en el sitio de infección, se desata una respuesta sistémica en partes distales de la planta con el fin de proteger a los tejidos sanos de una subsecuente invasión.

Se reconocen dos vías principales mediante las cuales se pueden inducir respuestas de defensa sistémica en plantas: (i) Resistencia Sistémica Adquirida (SAR); y (ii) Resistencia Sistémica Inducida (ISR). La respuesta SAR requiere la implicación del SA y es predominantemente efectiva contra fitopatógenos biotrofos (Durrant y Dong, 2004). La respuesta ISR –originalmente definida como el resultado de la colonización de las plantas por ciertas rizobacterias no patógenas– no depende de la ruta de señalización del SA, sino del JA/ET y es efectiva contra fitopatógenos necrotrofos, heridas y ataque de insectos herbívoro (van Loon y col., 1998). En presencia de múltiples agresores estas rutas de señalización se pueden interconectar y actuar de modo antagónico o sinérgico, lo que demuestra que las plantas son capaces de regular y refinar su respuesta inmune (Pieterse y col., 2009). Entre el arsenal de respuestas de defensa activadas en las plantas tras el reconocimiento de los PAMPs/MAMPs/DAMPs (Hammond-Kosack y Jones, 1996), se encuentran: la respuesta hipersensible (HR), o muerte celular programada localizada en el sitio de infección para restringir el crecimiento del patógeno (Mur y col., 2008); la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS) (Molassiotis y Fotopoulos, 2011) y compuestos antimicrobianos; el refuerzo estructural del tejido vegetal mediante la formación de lignina; y la secreción de proteínas de defensa PR

(*Pathogenesis-Related Proteins*) que presentan generalmente actividad antimicrobiana (van Loon y col., 2006).

Durante la evolución de la interacción microorganismo-planta, los organismos fitopatógenos exitosos han ido adquiriendo proteínas efectoras que les permiten, no solo evadir la respuesta inmune de la planta hospedadora, sino modularla en su propio beneficio para crear un entorno adecuado para su proliferación. En el caso de microorganismos beneficiosos, al ser reconocidos inicialmente como potenciales invasores hostiles, también deben ser capaces de modular la respuesta inmune de la planta con el fin de garantizar el establecimiento de una asociación mutualista (Zamioudis y Pieterse, 2012). A su vez, las plantas han ido adquiriendo proteínas de resistencia (*R*), capaces de reconocer específicamente a las proteínas efectoras secretadas por el potencial agente fitopatógeno e inducir, consecuentemente, otra tanda de respuestas de defensa. Según el modelo de resistencia gen a gen, cuando los productos de los genes de avirulencia (genes *Avr*) secretados por el potencial organismo fitopatógeno interactúan con los productos de los genes de resistencia (genes *R*) secretados por la planta hospedadora, se activa la maquinaria de defensa de la misma, alcanzando esta un estado de resistencia (van der Biezen y Jones, 1998). Así, la consecución de resistencia dependerá de la carrera desatada entre la planta hospedadora y el microorganismo invasor tras su reconocimiento, es decir, del balance entre la habilidad del organismo fitopatógeno para suprimir el sistema inmune de la planta hospedadora y la capacidad de esta para reconocer al fitopatógeno y activar estrategias de defensa efectivas. De este modo, si el microorganismo invasor logra evadir el reconocimiento o si es capaz de contrarrestar las respuestas de defensa de la planta hospedadora, actuará como un patógeno virulento y la planta será susceptible a la enfermedad (reacción compatible). Por el contrario, si el microorganismo invasor no consigue escapar de las respuestas de defensa de la planta hospedadora, se impide el establecimiento de la enfermedad (reacción incompatible) y se tratará, por tanto, de un patógeno avirulento. La carrera coevolutiva entre microorganismos y plantas se puede entender mediante el modelo del zigzag propuesto por Jones y Dangl (2006). En la **Figura 3** se representa a través de dicho modelo la activación/desactivación del sistema inmune de las plantas, tanto por parte de microorganismos fitopatógenos como por parte de ciertas cepas de *Trichoderma* capaces de modular la respuesta inmune de las plantas, ya sea amplificando su estado de inmunidad basal y/o reduciendo sus respuestas de susceptibilidad (Lorito y col., 2010).

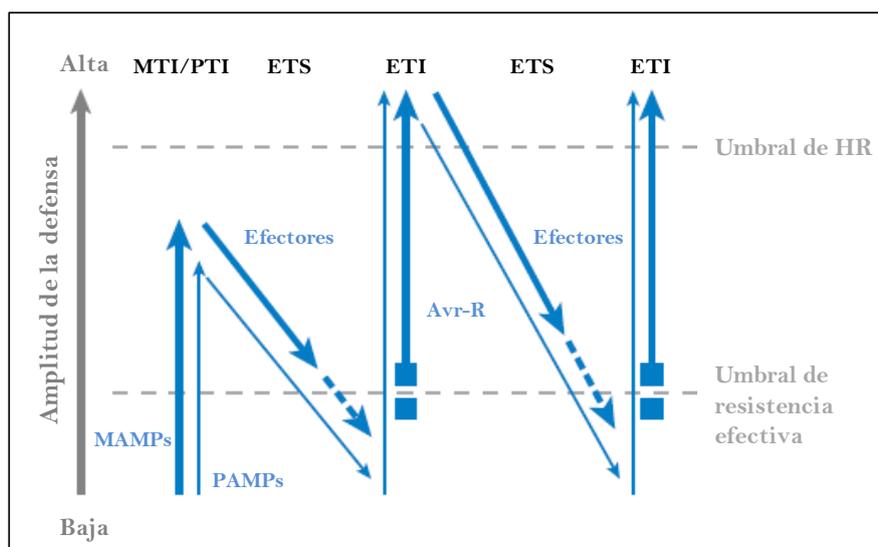


Figura 3. Cambios en la amplitud de la defensa de la planta frente al ataque de organismos fitopatógenos por la acción de cepas de biocontrol de *Trichoderma* (Lorito y col., 2010), representados mediante el modelo del zigzag propuesto por Jones y Dangl (2006). Las flechas azules delgadas indican la respuesta de defensa de la planta tras el reconocimiento de microorganismos fitopatógenos. Las flechas azules gruesas indican la respuesta de la planta en presencia de *Trichoderma* spp. En la primera fase, las plantas detectan los patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMPs/MAMPs, *Pathogen/Microbe-associated molecular patterns*) mediante receptores transmembranales PRRs (*pattern recognition receptors*). En el caso de microorganismos fitopatógenos, este reconocimiento deriva en un estado de inmunidad denominado PTI (*PAMP-triggered immunity*) en el que se puede detener el proceso de colonización del microorganismo. En la segunda fase, los fitopatógenos exitosos pueden desplegar proteínas efectoras que contribuyen con su virulencia o que, alternativamente, interfieren con PTI, lo que conduce a un estado de susceptibilidad denominado ETS (*effector-triggered susceptibility*). En la tercera fase, un efector dado (proteína Avr) es específicamente reconocido, directa o indirectamente, por una de las proteínas NB-LRR (*nucleotide binding - leucine rich repeat*) codificadas por los genes de resistencia *R* de la planta, reconocimiento que conduce nuevamente a un estado de inmunidad, denominado en este caso ETI (*effector-triggered immunity*). La respuesta ETI es una versión amplificada de la respuesta PTI, y, por lo general, deriva en un estado de resistencia al generar muerte celular en el sitio de la infección (HR, *hypersensitive response*). En la cuarta fase, la selección natural conduce a los fitopatógenos a evadir la respuesta ETI ya sea librándose del gen efector reconocido, diversificándolo o bien adquiriendo efectores adicionales capaces de suprimir el estado de inmunidad ETI. El proceso de selección natural favorece la incorporación de nuevos alelos *R* cuyos productos génicos son capaces de reconocer uno de los nuevos efectores adquiridos, de tal modo que la respuesta ETI pueda ser desencadenada nuevamente. En resumen, la amplitud final de la resistencia a la enfermedad o de la susceptibilidad es proporcional a [PTI-ETS+ETI]. En el caso del género *Trichoderma*, ciertas especies son capaces de incrementar el nivel de inmunidad basal mediante la producción de una variedad de MAMPs, cuyo reconocimiento conduce a la planta a un estado de inmunidad denominado MTI (*MAMPs-triggered immunity*) (MTI>PTI). Además, dichas especies tienen la habilidad de contrarrestar la acción de los efectores producidos por los fitopatógenos que causan ETS, limitando así la pérdida de resistencia y manteniendo, de este modo, la respuesta de la planta en un nivel por encima, o justo por debajo, del umbral de resistencia efectiva (<ETS). Algunas especies de *Trichoderma* también pueden aumentar ETI ya sea acelerando la respuesta de defensa (*priming*) o activando las respuestas de defensa mediante la producción de proteínas (Avr) específicamente reconocidas por los receptores (R) de la planta.

Se han identificado numerosos metabolitos primarios y secundarios que actúan como MAMPs o que liberan DAMPs durante la interacción *Trichoderma*-planta (Hermosa y col., 2013). Tras su reconocimiento, ocurre un cambio en el flujo intracelular de iones Ca^{2+} que desencadena la activación de las distintas rutas de señalización (Navazio y col., 2007). Inicialmente, se consideraba que la capacidad de las cepas de *Trichoderma* para inducir respuestas de defensa era vía ISR, es decir que involucraba las rutas de señalización de JA/ET (Shoresh y col., 2010), aunque cada vez se dispone de más evidencias que indican la existencia de un solapamiento entre las rutas JA/ET, SA y ABA (Korolev y col., 2008; Salas-Marina y col., 2011; Tucci y col., 2011; Mathys y col., 2012). En este sentido, la resistencia sistémica inducida es un proceso flexible que involucra distintas rutas de señalización hormonal cuya activación/desactivación depende de muchos factores como la cepa de *Trichoderma*, de su concentración, del genotipo y estado fisiológico de la planta, del tiempo de interacción, así como del modo de acción del fitopatógeno. Más aún, las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de activar las defensas de las plantas para que estas respondan solamente tras el ataque del patógeno (Shoresh y col., 2010; Hermosa y col., 2013). Este fenómeno se conoce como *priming* y se define como una condición fisiológica en la que las plantas son capaces de responder mejor y/o más rápido frente a estreses bióticos y abióticos (Conrath, 2011). Desde el punto de vista energético, el estado de *priming* reduce el coste metabólico que supone a las plantas mantener sus defensas activas en ausencia de organismos patógenos (van Hulten y col., 2006).

3.5. Promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas

El potencial de ciertas especies del género *Trichoderma* para proteger a las plantas del ataque de diversos microorganismos e incluso de nematodos es tan solo una parte de sus atributos como ACBs. La asociación directa *Trichoderma*-planta, además de inducir las defensas, puede estimular respuestas de crecimiento y desarrollo (Shoresh y col., 2010). El efecto promotor del crecimiento vegetal por parte de algunas especies de *Trichoderma* es un fenómeno ampliamente documentado y podría entenderse, en cierta medida, como una consecuencia indirecta de la capacidad de estas para controlar agentes fitopatógenos menores, degradar compuestos del suelo que resultan tóxicos para las plantas y/o protegerlas frente a otros tipos de estrés. Sin embargo, se ha visto que también pueden promover crecimiento en circunstancias en las que las plantas no están sometidas a ningún estrés, lo cual indica que son capaces de ejercer un efecto directo sobre el crecimiento y el desarrollo vegetal. De hecho, se ha

comprobado que algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de estimular el sistema respiratorio y fotosintético de las plantas, lo cual se traduce en una mayor disponibilidad de carbono y energía para crecer.

Se han propuesto dos mecanismos generales de acción como responsables del efecto biofertilizador por parte de especies rizocompetentes de *Trichoderma*: (i) producción de factores de crecimiento como hormonas y otros metabolitos secundarios, y/o regulación de los niveles de estos compuestos en la planta (Contreras-Cornejo y col., 2009; Viterbo y col., 2010; Vinale y col., 2012); (ii) incremento de la disponibilidad de nutrientes mediante su solubilización (Altomare y col., 1999; Qi y Zhao, 2013; Vinale y col., 2013).

4. SIMBIOSIS MULTIFUNCIONAL *Trichoderma*-PLANTA

Tradicionalmente, las especies del género *Trichoderma* eran consideradas como hongos saprófitos del suelo, de vida libre, cuya habilidad para parasitar a hongos fitopatógenos dio lugar a su uso como ACBs. Posteriormente, han sido definidas como simbioses oportunistas avirulentos de plantas por su capacidad de asociarse de manera íntima con las raíces vegetales y, como resultado, promover el crecimiento de los cultivos y estimular sus respuestas de defensa frente al estrés biótico generado tras el ataque de organismos fitopatógenos y plagas (Harman y col., 2004). Hoy en día, se han redefinido como simbioses multifuncionales antiestrés debido a los múltiples efectos beneficiosos que le brindan a los cultivos (Harman, 2011) (**Figura 4**).

4.1. Establecimiento de la asociación simbiótica *Trichoderma*-planta

El establecimiento de la asociación simbiótica entre las especies rizocompetentes de *Trichoderma* y las plantas se inicia con el reconocimiento de las raíces. Se ha sugerido que la sacarosa exudada por las raíces juega un papel crucial en la señalización e iniciación de la colonización y que su metabolismo está implicado en la regulación de este proceso (Vargas y col., 2011). Aparentemente, durante las etapas iniciales de la interacción, un transportador de origen fúngico media el transporte activo de sacarosa desde la rizosfera hacia las células fúngicas. Una vez que la molécula de sacarosa se encuentra en el interior celular es metabolizada por la acción de una invertasa. El siguiente paso tras el reconocimiento es la colonización del sistema radical, proceso que implica la adherencia del micelio a la superficie de las raíces y la penetración física de las mismas. Habitualmente, el hongo crece en contacto con la

exodermis de la raíz y se mantiene adherido a esta gracias a la acción de hidrofobinas (Viterbo y Chet, 2006). Posteriormente, el hongo penetra el tejido de la raíz sin degradar extensivamente las paredes celulares y se mantiene en las capas externas de la epidermis (Yedidia y col., 1999). La penetración se ve facilitada por la acción conjunta de CWDEs y de proteínas tipo expansinas que modifican la arquitectura de las paredes celulares (Brotman y col., 2008; Morán-Diez y col., 2009). Al parecer, con el propósito de garantizar la colonización, el hongo es capaz de reprimir transitoriamente las respuestas tempranas de defensa activadas en la planta tras el reconocimiento de los MAMPs/DAMPs (Morán-Diez y col., 2012; Brotman y col., 2013). La planta, por su parte, en un proceso mediado por SA (Alonso-Ramírez y col., 2014), refuerza sus paredes celulares y crea barreras estructurales confinando al hongo en los espacios intercelulares y en el córtex externo previniendo, de este modo, su ingreso en el sistema vascular (Yedidia y col., 1999; Chacón y col., 2007). Otra estrategia de defensa de la planta frente a la invasión del hongo es la producción de compuestos antifúngicos, de manera que el éxito de la colonización dependerá de la habilidad de cada cepa para tolerar los metabolitos tóxicos producidos por la planta – habilidad asociada, al igual que en el proceso micoparasítico, con la presencia de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) (Woo y col., 2006; Ruocco y col., 2009)–, así como de la habilidad para suprimir la producción de los mismos (Masunaka y col., 2011).

4.2. Protección de las plantas frente a estreses abióticos y promoción del uso eficiente del nitrógeno

La asociación simbiótica *Trichoderma*-planta puede proteger a los cultivos del efecto de diferentes tipos de estrés abiótico –como el estrés hídrico, salino y térmico– e incluso fisiológico –como el envejecimiento de semillas– mediante la activación de una maquinaria antioxidante de defensa frente al daño oxidativo generado por la acumulación de ROS en las plantas durante el estrés y, a su vez, mediante la reducción de los niveles de etileno (Mastouri y col., 2010, 2012; Brotman y col., 2013; Contreras-Cornejo y col., 2014). Además, ciertas especies de *Trichoderma* pueden paliar los efectos fitotóxicos ocasionados por metales pesados presentes en el suelo, no solo por su capacidad de metabolizar dichos compuestos, sino por incrementar el nivel de tolerancia de las plantas (Siddiquee y col., 2013; Tripathi y col., 2013a,b). Asimismo, la capacidad de *Trichoderma* spp. de degradar aleloquímicos exudados por las plantas

puede aliviar el estrés que supone la práctica del monocultivo (Chen y col., 2011b). Más aún, la simbiosis *Trichoderma*-planta promueve que las plantas operen de manera más eficiente a nivel metabólico, estimulando además del sistema fotosintético, el uso eficiente del nitrógeno (Shoresh y col., 2010). Todos estos efectos beneficiosos podrían llegar a ser aun más valiosos en agricultura que el propio control de enfermedades, pues no solo se traducen en la obtención de cultivos potencialmente más sanos y con mayores rendimientos sino que, a su vez, el uso eficiente de los recursos por parte de las plantas supone un menor requerimiento de fertilizantes químicos e implicaría menor contaminación del medio ambiente. No obstante, cabe resaltar que los efectos positivos observados como consecuencia de la simbiosis *Trichoderma*-planta depende tanto del genotipo del hongo como de la planta, del estado fisiológico de la misma, así como de la concentración de inóculo (Segarra y col., 2007; Tucci y col., 2011) y que, además, muchos de estos efectos positivos solo se consiguen cuando las plantas están sometidas a condiciones de estrés abiótico (Donoso y col., 2008; Mastouri y col., 2010).

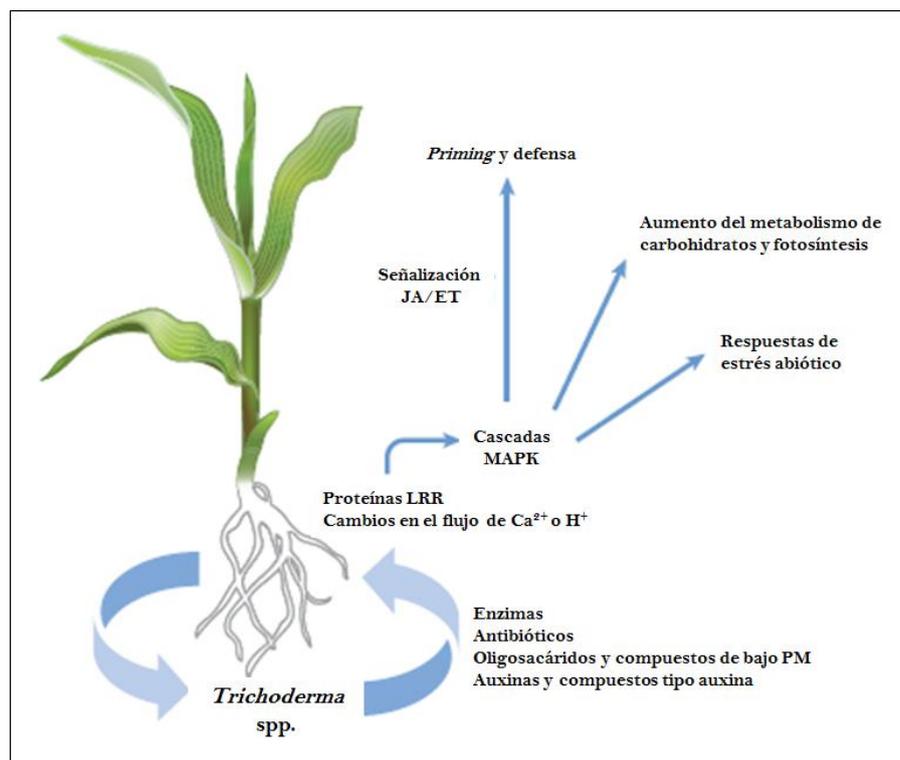


Figura 4. Representación esquemática de los efectos beneficiosos globales de la interacción directa *Trichoderma*-planta (Shoresh y col., 2010). PM, peso molecular; LRR, *Leucine-Rich-Repeat*; MAPK, *Mitogen-Activated-Protein Kinase*; JA, ácido jasmónico; ET, etileno.

5. "ÓMICAS" EN *Trichoderma* spp.

Desde el nacimiento de la biología molecular, los investigadores han planteado e intentado resolver los problemas biológicos estudiando la función de los genes y productos génicos de forma individualizada. Esta aproximación "reduccionista" ha demostrado ser enormemente fructífera y ha permitido descubrir numerosos principios biológicos, sin embargo, muchas preguntas fundamentales permanecen sin respuesta. Este hecho se debe a que la mayoría de productos génicos actúan de forma conjunta y, por tanto, los procesos biológicos deben considerarse como redes complejas cuyos componentes están interconectados (Ge y col., 2003).

El término genómica hace referencia al estudio multidisciplinario de los genomas, y se puede abordar tanto a nivel estructural como funcional. A partir de este concepto han surgido otros términos, como transcriptómica, proteómica o metabolómica, que hacen referencia al estudio de las moléculas de ARN, proteínas y metabolitos, respectivamente, producidas por un organismo dado en un momento determinado y bajo condiciones definidas. Todas estas aproximaciones se basan en el desarrollo de tecnologías de procesamiento rápido y masivo de datos que reciben en conjunto el nombre genérico de "ómicas", campo en el que la bioinformática cumple un papel fundamental (Kanehisa y Bork, 2003; Yu y col, 2004).

Los proyectos de secuenciación constituyen uno de los principales aportes a nivel genómico. En los últimos años se han liberado los genomas completos de ocho especies de *Trichoderma* de gran interés. La primera especie secuenciada fue *T. reesei* QM6a, caracterizada por su estilo de vida saprofito y empleada a nivel industrial por su gran capacidad de secretar celulasas y hemicelulasas (Martínez y col., 2008). Adicionalmente, se secuenció el genoma de la cepa mutante hipersecretora *T. reesei* RUT-C30, obtenida a partir de la cepa silvestre QM6a y explotada para la producción de enzimas y proteínas recombinantes (Peterson y Nevalainen, 2012). Más recientemente se han secuenciado los genomas de cuatro especies micoparasíticas ampliamente utilizadas como ACBs: *T. atroviride* IMI 206040, *T. virens* Gv29-8, *T. asperellum* CBS 433.97 y *T. harzianum* CBS 226.95; así como los genomas de dos especies que actúan como patógenos en humanos: *T. citrinoviride* CBS 258.85 y *T. longibrachiatum* ATCC 18648. Las secuencias genómicas de estas especies se encuentran disponibles en el portal del *DOE Joint Genome Institute* (<http://genome.jgi.doe.gov/Trichoderma/Trichoderma.info.html>) (Grigoriev y col., 2012). Además, se ha liberado el primer borrador del genoma de *T. hamatum* GD12,

especie con gran potencial agrícola por su capacidad de micoparasitar diversos fitopatógenos del suelo y, como otros ACBs de este género, también es capaz de promover el crecimiento de plantas e inducir resistencia sistémica frente a patógenos foliares. Su secuencia se encuentra depositada en la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank bajo el número de acceso ANCB00000000 (Studholme y col., 2013). Últimamente, se ha secuenciado el genoma de la cepa *T. longibrachiatum* SMF2, eficiente secretora de celulasas (Xie y col., 2014).

La disponibilidad de los genomas completos de *Trichoderma* spp. ha permitido llevar a cabo estudios comparativos que han favorecido de forma considerable el entendimiento de la base genética que subyace tras sus distintos estilos de vida. Por un lado, el análisis comparativo del genoma de la especie saprofita *T. reesei* con los de las especies micoparásitas *T. atroviride* y *T. virens* no solo ha facilitado la identificación de genes que avalan un estilo de vida micoparasítico, sino que ha demostrado que dichos genes surgieron de un ancestro común y que posteriormente fueron perdidos en *T. reesei* (Ihrmark y col., 2010; Kubicek y col., 2011). Por otro lado, el análisis comparativo del transcriptoma de estas tres especies ha revelado que la habilidad de *T. atroviride* y *T. virens* de antagonizar hongos y oomicetos fitopatógenos recae en distintas estrategias de micoparasitismo que dependen más de la regulación de la expresión génica que de la presencia en su genoma de un repertorio de genes específicos de micoparasitismo (Atanasova y col., 2013). Recientemente se ha planteado que *T. longibrachiatum* también habría sufrido, al igual que *T. reesei*, la pérdida de genes implicados en micoparasitismo, pero que el estilo de vida saprofítico que caracteriza a ambas especies no se debe a dicha pérdida ni a la ganancia de genes implicados en la degradación de celulosa y hemicelulosa, sino a una mayor presión selectiva sobre estos genes que habría conducido a una optimización de su expresión génica y/o de la actividad de sus productos génicos (Xie y col., 2014). Además se ha demostrado que *T. parareesei*, la especie filogenéticamente más próxima a *T. reesei*, sí posee una importante actividad antagonista frente a organismos fitopatógenos (Rubio y col., 2014). Por su parte, la comparación de los genomas de *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* con el de *T. hamatum* ha permitido identificar regiones únicas que potencialmente podrían codificar nuevos metabolitos bioactivos responsables de los múltiples efectos beneficiosos de esta especie sobre los cultivos (Studholme y col., 2013). A su vez, el estudio comparativo del genoma de la cepa *T. reesei* QM6a con el de dos mutantes hipercelulolíticos obtenidos a partir de esta cepa (NG14 y RUT-30) ha hecho posible la

identificación de mutaciones potencialmente relacionadas con la mayor capacidad secretora de las cepas mutantes (Le Crom y col., 2009). La disponibilidad de la secuencia del genoma de *T. reesei* QM6a también ha facilitado el estudio de la reproducción sexual en esta especie (Seidl y col., 2009a; Schmoll y col., 2010). Este avance abre la posibilidad para el desarrollo de programas de mejora genética mediante el cruce de cepas, ya sea tanto de *T. reesei* como de otras especies. Igualmente, el estudio de los genomas de *T. citrinoviride* y *T. longibrachiatum*, puede brindar pistas valiosas sobre los eventos evolutivos que han llevado a estas especies a invadir nuevos nichos y comportarse como patógenos.

El advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (*NGS*, *Next-Generation Sequencing*) (Nowrousian, 2010), además de permitir la identificación de genes asociados con las propiedades beneficiosas o nocivas de *Trichoderma* spp. que podrían funcionar como marcadores rasgo-específicos para la rápida selección de cepas de interés industrial o agrícola, así como para el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a estreses abióticos y bióticos, ofrece la oportunidad de descubrir, alternativamente a la vía proteómica, nuevos promotores fuertes, ya sean constitutivos o inducibles, que podrían utilizarse para la obtención de cepas de *Trichoderma* con características mejoradas.

Uno de los mayores retos en esta era postgenómica será la rápida elucidación de la función de genes de *Trichoderma* spp. con potencial interés. Actualmente, la genómica funcional de hongos se apoya en el empleo de estrategias que permiten realizar análisis masivos, tales como la generación a gran escala de librerías de mutantes nulos y la elaboración de bases de datos fenotípicas (Chen y col., 2011a; Son y col., 2011; Park y col., 2011). La aplicación de este tipo de estrategias para el análisis funcional en *T. reesei* es posible hoy en día gracias al reciente desarrollo de procedimientos para la construcción de mutantes nulos a gran escala (Schuster y col., 2012). Además, resulta fundamental adquirir un conocimiento integral acerca de los mecanismos responsables de la regulación de la expresión génica, lo cual sería factible mediante el uso de técnicas optimizadas para la identificación a gran escala y con alta sensibilidad de elementos reguladores *cis* (Gorsche y col., 2014). Asimismo, la reciente identificación de *milRNAs* (*microRNA-like small RNAs*) en *T. reesei* supone un gran aporte para el estudio de la regulación génica en esta y otras especies de *Trichoderma* (Kang y col., 2013).

En definitiva, la ejecución de proyectos basados en herramientas "ómicas" constituyen una plataforma inestimable para la explotación del potencial genético de *Trichoderma* spp. De hecho, la información generada a partir de dichos proyectos ya está teniendo muchas aplicaciones de gran impacto agrícola (Lorito y col., 2010; Mukherjee y col., 2013). El mayor entendimiento obtenido acerca de los procesos micoparasítico y mutualista *Trichoderma*-planta se traduce en la reciente aparición en el mercado de productos de nueva generación formulados a base de cepas efectivas de *Trichoderma* que se caracterizan por ofrecer múltiples efectos beneficiosos a los cultivos (Harman y col., 2010; Lorito y col., 2010). La selección de estas cepas y la determinación de combinaciones apropiadas cepa-cultivar se ha visto favorecida no solo por la identificación de genes y metabolitos relevantes, sino por la caracterización de las rutas y mecanismos moleculares implicados en el control biológico. Gracias a la implementación de nuevos y mejores tratamientos basados en este tipo de productos junto con el desarrollo de técnicas adecuadas de manejo agrícola, se está consiguiendo una protección más eficiente de diversos cultivos así como una mayor productividad y rentabilidad para el agricultor (Lorito y col., 2010).

Objetivos

Como ha quedado reflejado en la Introducción General de esta memoria, la interacción directa *Trichoderma*-planta juega un papel fundamental en los múltiples efectos beneficiosos que las especies del género *Trichoderma* ejercen sobre los cultivos. Sin embargo, hoy en día apenas se conoce cómo se relacionan los mecanismos moleculares que subyacen tras dicha interacción. Entender cómo actúan las especies de *Trichoderma* a nivel molecular y qué factores intervienen en el establecimiento del diálogo con las plantas es primordial no solo para favorecer la rápida identificación de cepas efectivas y sus aplicaciones agrícolas, sino también para poner de manifiesto el potencial de mejora genética de las cepas naturales, así como de las plantas, con objeto de alcanzar un efecto biofertilizante, bioestimulante y bioprotector duradero frente a diversos tipos de estrés.

Con estos antecedentes, el propósito del presente trabajo ha sido **profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la interacción *Trichoderma*-planta a través de una aproximación transcriptómica**. A partir de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Diseño de un *microarray* de alta densidad de oligonucleótidos para especies del género *Trichoderma*, orientado a estudios de expresión génica: "Trichochip v. 1.0".
2. Análisis de la respuesta transcriptómica de *T. harzianum* CECT 2413 en la interacción con plantas de tomate en comparación con otras condiciones nutricionales, utilizando el *microarray* desarrollado en el objetivo 1.
3. Identificación de genes inducidos en *T. harzianum* CECT 2413 en presencia de plantas de tomate, y caracterización biológico-funcional de los genes seleccionados (*qid74* y *asp1*) mediante estrategias de sobreexpresión, silenciamiento y/o disrupción génica.

Capítulo I. Diseño de un *microarray* de alta densidad de oligonucleótidos para estudios de expresión génica en especies de *Trichoderma*: "Trichochip v. 1.0". Identificación de genes inducidos en *T. harzianum* durante la interacción con plantas de tomate.

INTRODUCCIÓN

Un *microarray* de ADN (también llamado *gene chip* o *biochip*) es un dispositivo de pequeño tamaño que contiene un gran número de moléculas de ADN (oligonucleótidos, ADNc, o productos de PCR) inmovilizadas de manera ordenada sobre un soporte físico (vidrio, plástico, silicio, etc.), formando una matriz de dos dimensiones (filas y columnas), con el que se puede obtener información acerca del material genético (secuencias, mutaciones, datos de expresión génica, etc.) de un organismo. En concreto, los "*microarrays* de expresión de alta densidad de oligonucleótidos" permiten medir la expresión de genes a escala genómica-transcriptómica. Para ello, miles de fragmentos de ADNc marcados (por métodos enzimáticos, fluorescentes, etc.) -obtenidos como copias del ARNm total procedente de la muestra en estudio- se incuban sobre el panel de fragmentos de oligonucleótidos o "sondas" inmovilizadas en el *microarray*, produciéndose así la hibridación entre moléculas complementarias. Cada *microarray* contiene sondas con secuencias de todo el transcriptoma del organismo de interés. Al conjunto o serie de sondas que representan a las distintas regiones codificantes de cada gen se le denomina *set* de sondas. El diseño de las sondas y su producción son elementos clave a la hora de hacer posible la hibridación en el *microarray*. Sin la riqueza de conocimiento y datos de secuencias disponibles en las bases de datos y proyectos genómicos, la generación de estas sondas sería imposible.

La elevada densidad de integración de los *microarrays* de oligonucleótidos se debe a su arquitectura ya que están divididos en un gran número de pequeñas celdillas (llegan incluso a los cientos de miles) que se utilizan como tubos de ensayo en los que se produce una reacción de hibridación. Cada celdilla contiene, a su vez, millones de copias idénticas de un oligonucleótido o sonda en particular (**Figura 5**). El análisis computacional de los datos generados a partir de todas las sondas hibridadas permite cuantificar la expresión de miles de genes simultáneamente en un solo *microarray*. Esta cuantificación será proporcional a la cantidad de ARNm transcrito de cada gen.

De hecho, en el punto de partida de esta Tesis Doctoral, no se disponía del genoma anotado de ninguna de las especies de *Trichoderma* comúnmente utilizadas como ACBs. Por esta razón, en el presente trabajo nos propusimos desarrollar un *microarray* "hecho a medida" que incluyera sondas de ADN (oligonucleótidos) representativas de una amplia colección disponible de secuencias ESTs (*Expressed Sequence Tag*) de distintas especies de *Trichoderma*. Estas ESTs habían sido generadas

en un proyecto anterior (proyecto UE "TrichoEST: *functional genomics and proteomics of Trichoderma antagonist strains for industry and agriculture*"; Rey y col., 2004; Vizcaíno y col., 2006) que supuso un aporte fundamental para el estudio a nivel transcripcional de especies del género *Trichoderma*, al llevarse a cabo la secuenciación de más de 25.000 ESTs de ocho especies diferentes representativas de la gran diversidad de este género (*T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. stromaticum* y *T. aggressivum*). El proceso que se requiere para la obtención de una librería de ESTs se representa gráficamente en la **Figura 6**. Cabe resaltar que la mencionada colección de ESTs se generó a partir de 28 librerías de ADNc de especies de *Trichoderma* cultivadas en un amplio rango de condiciones de crecimiento, incluyendo condiciones relacionadas con el biocontrol. Adicionalmente, puesto que el único genoma completo disponible de una especie de *Trichoderma* en el momento de emprender este trabajo era el de la cepa saprófita *T. reesei* QM6a (Martínez y col., 2008), se diseñaron sondas sobre las secuencias de todos los transcritos deducidos de dicho genoma, las cuales también fueron incluidas en el *microarray*.

En el presente capítulo se resume someramente el proceso bioinformático llevado a cabo para el diseño y selección de las sondas que conformaron el llamado "Trichochip", en su versión 1.0, así como los resultados obtenidos tras su utilización en el estudio de la respuesta transcriptómica de la cepa *T. harzianum* CECT 2413 en presencia de plantas de tomate, quitina, glucosa o medio mínimo. El análisis se enfoca principalmente en la identificación de genes implicados en la interacción *Trichoderma*-planta.

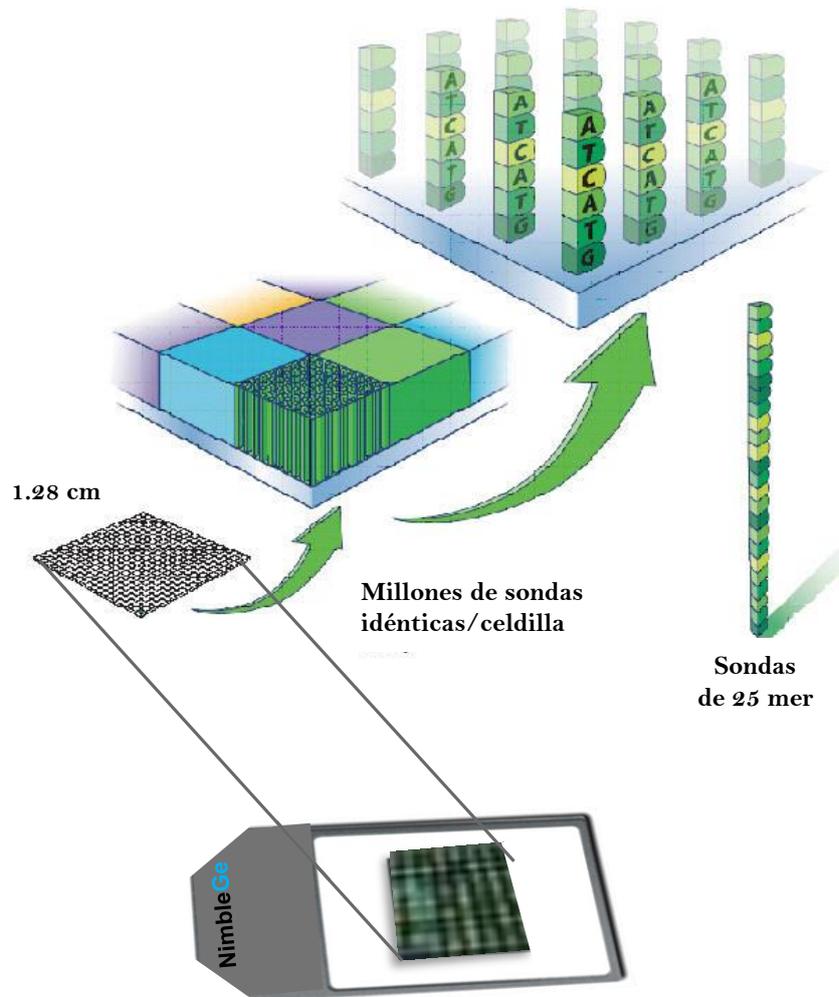


Figura 5. Representación esquemática de la arquitectura de un *microarray* de oligonucleótidos de alta densidad (con 385.000 celdillas). Cada celdilla contiene millones de copias idénticas de una sonda de 25 mer.

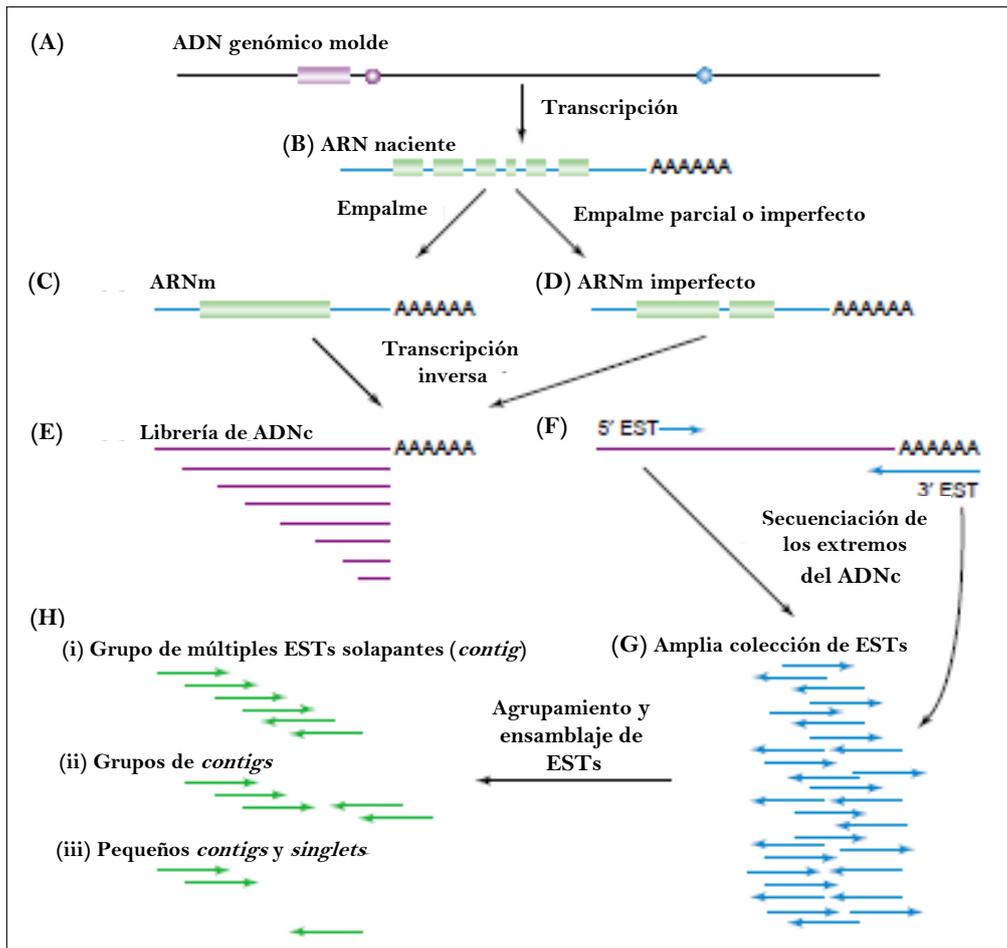


Figura 6. Esquema del proceso de generación de una librería de ESTs (tomado de Rudd, 2003). El ADN genómico molde (A) contiene elementos regulatorios y señales que definen la localización de un gen y que son reconocidos en la célula por la maquinaria de transcripción de ADN. La región codificante del gen se transcribe generando una molécula de ARN (B). El ARN naciente refleja la estructura del gen y contiene UTRs (*Untranslated Regions*), intrones (líneas azules entre los bloques verdes) y exones (bloques verdes). Tras el corte de intrones y empalme de exones se forman moléculas perfectas (C) o imperfectas de ARNm (D). Para la obtención de las librerías de ESTs se extrae el ARN total de la célula y a partir de este se genera una población de ADNc mediante el uso de un oligo poli-T (E). Puesto que las colas poli-A de los extremos 3' se utilizan como marcadores para la selección de los ARNm, los extremos 3' tendrán mayor probabilidad de quedar representados dentro de la librería de ADNc que los extremos 5'. Posteriormente, la secuenciación de ADN tiene lugar desde ambos extremos del ADNc y, de este modo, se generan ESTs 5' y 3' (F). Estas secuencias se suman al conjunto de ESTs disponibles del organismo de interés y conforman una colección de ESTs (G). A continuación, mediante medios bioinformáticos se lleva a cabo el ensamblaje de secuencias solapantes con el fin de evitar redundancia. Como resultado del ensamblaje se obtienen secuencias únicas denominadas *contigs* (cuando resultan de dos o más ESTs) o *singlets* (ESTs individuales no solapantes) (H). El ensamblaje de un grupo de múltiples ESTs solapantes origina un *contig* extenso que puede representar fielmente la estructura génica (i). Grupos más reducidos de ESTs pueden originar pseudogrupos de *contigs* de menor longitud (ii) o bien puede que pocas ESTs formen pequeños *contigs* o que permanezcan como secuencias individuales (*singlets*) (iii).

RESULTADOS

1. DISEÑO Y COMPOSICIÓN DE UN MICROARRAY DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA ESPECIES DEL GÉNERO *Trichoderma*: "TRICHOCHIP v. 1.0"

El proceso de diseño y selección de sondas, cuyos resultados se resumen a continuación, se llevó a cabo en estrecha colaboración con personal bioinformático experto que desarrolló algoritmos *ad hoc* en cada una de las siguientes etapas:

- (i) **Ensamblaje de ESTs de diferentes cepas de *Trichoderma***: con el propósito de evitar la redundancia de secuencias debida a ESTs comunes entre las diferentes cepas de *Trichoderma*, en primer lugar se llevó a cabo un ensamblaje tipo CAP3 (Huang y Madan, 1999) con la colección completa de ESTs de partida de las distintas cepas (14.237 ESTs, ver apartado 7.1 de Materiales y Métodos), obteniéndose como resultado un total de 12.662 ESTs teóricamente de secuencia única (3.152 *contigs* y 9.510 *singlets*).
- (ii) **Generación de sondas**: a partir de los 3.152 *contigs* y 9.510 *singlets* anteriores, así como del total de transcritos anotados en el genoma de *T. reesei* QM6a (9.129), se generaron todas las sondas posibles de 25 nucleótidos (25 mer). Como resultado de esta etapa se obtuvieron un total de 18.881.401 sondas.
- (iii) **Alineamiento**: con el fin de evaluar la especificidad de las sondas generadas en el paso anterior, estas fueron alineadas con la totalidad de secuencias de partida. En este paso fueron descartadas por el algoritmo de selección todas aquellas sondas que no cumplieron con los criterios establecidos de unicidad y frecuencia, quedando así un total de 18.870.469 sondas.
- (iv) **Depuración**: la aplicación de diferentes filtros de calidad de secuencia (autocomplementariedad, contenido de GC de 40-60%, repetición consecutiva de nucleótidos menor a 5, contenido de cada nucleótido menor del 40% del tamaño de la sonda) dio como resultado un total de 6.060.523 sondas que superaron dichos criterios.
- (v) **Priorización**: con objeto de ajustar las 6.060.523 sondas obtenidas en el paso

anterior a la capacidad del *microarray* (385.000 sondas), estas se sometieron a un proceso final de priorización. Para ello, las sondas fueron distribuidas uniformemente a lo largo de cada transcrito, de tal modo que cada uno estuviera representado en el *microarray* por un mínimo de 10 sondas (con excepción de aquellas en las que menos de 10 sondas hubieran pasado los criterios de selección previos). De este modo se seleccionaron un total de 384.659 sondas diferentes [disponibles en la base de datos GEO (*Gene Expression Omnibus Database*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>) con el N.º de acceso GPL7702] cuya secuencia fue enviada a la empresa Roche-Nimblegen Inc. para la realización de un último análisis de validación de sondas, previo al proceso de fabricación del *microarray* (<http://www.nimblegen.com/company/technology/index.html>).

Al mapear las 384.659 sondas seleccionadas sobre la colección inicial de secuencias de partida (ESTs de *Trichoderma* spp. y transcritos deducidos del genoma de *T. reesei* QM6a) se comprobó que aproximadamente el 35% alineaba con secuencias ESTs mientras que el 65% lo hacía con transcritos de *T. reesei*, lo cual estaba en consonancia con el tamaño (en pares de bases) de ambas colecciones de secuencias (7,1 y 13,9 Mpb, respectivamente). Además, se encontró que el 1,5% de las sondas incluidas en el *microarray* alineaba con secuencias de ambas bases de datos.

En la **Figura 7** se muestra la composición final del "Trichochip" en términos del número de secuencias de las distintas cepas de *Trichoderma* representadas por un *set* de sondas. Tan solo 147 ESTs (1%) de *Trichoderma* spp. y 8 transcritos (0,1%) de *T. reesei* quedaron sin representación en el *microarray*, debido a que las sondas diseñadas sobre estas secuencias no superaron los criterios de selección establecidos. Las secuencias no representadas están disponibles como material suplementario en Samolski y col., 2009 (*additional file 1*). El número de sondas que representan a cada secuencia en particular (tamaño del *set* de sondas) varió de 1 a 94 en el caso de ESTs de *Trichoderma* spp., y de 1 a 1245 en el caso de transcritos deducidos del genoma de *T. reesei*, con una mediana de 16 y 22, respectivamente, y con una separación máxima entre dos sondas adyacentes de aproximadamente 40 nucleótidos.

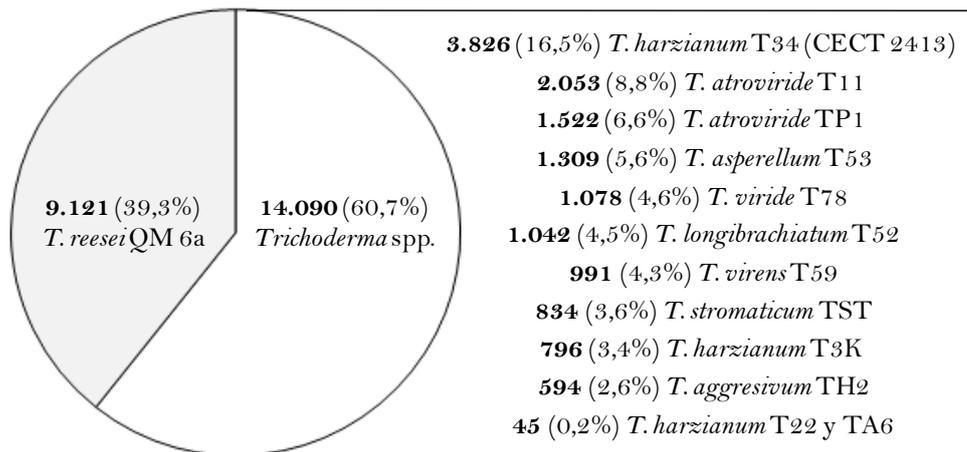


Figura 7. Composición del "TrichoChip" con relación al número de secuencias de cada cepa de *Trichoderma* con representación (equivalente al número de *sets* de sondas).

2. RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA DE *T. harzianum* CECT 2413 EN DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO

Con el propósito de analizar la respuesta transcriptómica de *T. harzianum* CECT 2413 en la interacción con plantas de tomate y compararla con otras condiciones nutricionales, se hibridaron 8 "TrichoChips" (2 por cada condición) con ADNc obtenido de micelio cultivado, durante 9 horas, en presencia de plantas de tomate (MS-P), quitina al 1% (p/v) (MS-Q), glucosa al 2% (p/v) (MS-G), o medio MS basal (MS) como condición de referencia (7.4 de Materiales y Métodos). El diseño experimental seguido se representa en la **Figura 8**.

2.1. Control de calidad y cálculo de la señal por *set* de sondas (gen) y por *microarray* (muestra)

En primer lugar, antes de llevar a cabo el tratamiento y análisis de los datos obtenidos tras la hibridación de los *microarrays*, se inspeccionaron las imágenes de expresión de cada uno de ellos a partir de los datos crudos del escáner, con el fin de identificar posibles rayados o defectos observables como manchas o zonas de hibridación desigual. Una vez descartado esto, se examinó la distribución general de las intensidades de las sondas sin observarse desviaciones aparentes. Los datos crudos se depositaron en la base de datos GEO (*Gene Expression Omnibus Database*) disponible en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/> con el N.º de acceso GSE13776. Posteriormente, se llevó a cabo el cálculo de la señal de expresión por cada

set de sondas en cada uno de los *microarrays* de modo global multimuestra, utilizando el algoritmo RMA (*Robust Multi-Array Average*) que incluye tres pasos: (i) corrección del ruido de fondo (*background*); (ii) normalización por cuantiles (Irizarry y col., 2003); (iii) cálculo sumariado de la señal por *set* de sondas. Los resultados de este algoritmo dieron lugar a los valores de expresión que se analizan en el apartado siguiente.

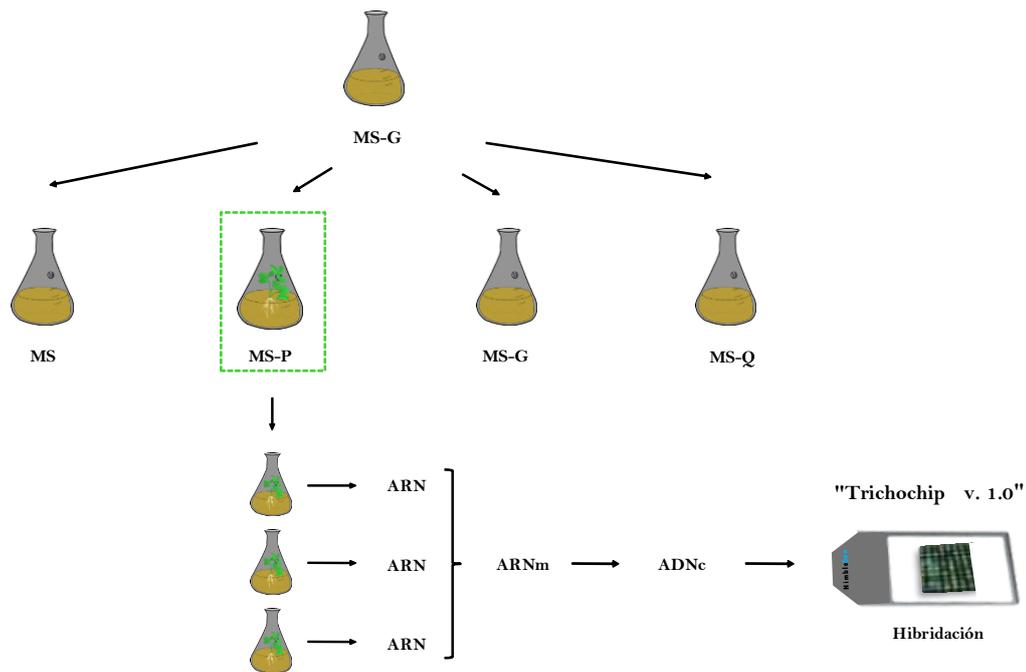


Figura 8. Esquema del diseño experimental seguido para el análisis del transcriptoma de *T. harzianum* CECT 2413 en condiciones de interacción con plantas de tomate (MS-P) utilizando el "Trichochip" desarrollado en este trabajo. Otras condiciones de crecimiento estudiadas fueron: medio MS suplementado con glucosa al 2% (p/v) (MS-G); medio MS suplementado con quitina al 1% (p/v) (MS-Q); medio MS basal (MS). Por cada condición de cultivo se realizaron tres réplicas biológicas independientes. Se mezclaron cantidades iguales del ARN extraído de cada réplica para purificar ARNm, a partir del cual se sintetizó ADNc. Para cada condición experimental se hibridaron dos "Trichochips" con ADNc obtenido en dos experimentos independientes.

2.2. Cálculo de la expresión diferencial significativa

A partir de los valores de expresión obtenidos para cada *set* de sondas, se aplicó el test multiclase SAM (*Significance Analysis of Microarray*) (Tusher y col., 2001) con el fin de identificar los *sets* de sondas que reflejaban cambios significativos en el nivel de expresión génica. Para ello, se utilizó una tasa FDR (*False Discovery Rate*) de 0,23, que indica el número máximo estimado de falsos positivos que se admiten en la lista de

genes con expresión diferencial significativa (Benjamini y Hochberg, 1995). De este modo, se identificaron 1.617 *sets* de sondas (7% del total de *sets* del *microarray*) que reflejaban cambios significativos de expresión en al menos una de las condiciones de cultivo estudiadas con respecto a las demás condiciones. De estos *sets*, aproximadamente el 51% habían sido diseñados a partir de secuencias de transcritos de *T. harzianum* CECT 2413 y el 49% restante a partir de secuencias de transcritos de otras cepas de *Trichoderma* (12% de *T. reesei* y 37% de otras cepas). Los datos de expresión obtenidos y los códigos de identificación de las secuencias correspondientes (ESTs o transcritos deducidos) se encuentran disponibles como material suplementario en Samolski y col., 2009 (*additional file 2*).

En términos generales, se encontró que la mayoría de estos *sets* de sondas (1.220) reflejaban cambios de expresión (más de dos veces por encima o por debajo; *fold* > 2) en alguna de las condiciones analizadas respecto a la condición control en medio basal MS. Concretamente, 596, 254, y 865 *sets* mostraron mayor o menor expresión (*fold* > 2) en MS-P, MS-Q y MS-G, respectivamente (**Figura 9A**). Con objeto de identificar aquellos *sets* de sondas con expresión diferencial específica de la condición MS-P (presencia de plantas de tomate) se llevó a cabo el análisis comparativo reflejado en la **Figura 9B**. De los 257 *sets* con mayor expresión en MS-P *vs.* MS, 95 (56+11+28) también se inducían en MS-G y/o en MS-Q, por lo que los 162 *sets* de sondas restantes representaban genes cuya expresión aumentaba únicamente en MS-P (20% del total de *sets* de sondas que mostraban un aumento en el nivel de expresión en alguna de las tres condiciones evaluadas). Por otra parte, de los 339 *sets* de sondas con menor expresión en MS-P *vs.* MS, 110 (37+2+71) también se reprimían en otras condiciones de cultivo, de modo que 229 *sets* de sondas respondían únicamente en MS-P (35% del total de *sets* de sondas que mostraban una disminución en el nivel de expresión en alguna de las tres condiciones evaluadas).

A

Condición	<i>Fold</i> > 2 y FDR: 0,23		
	(+)	(-)	Total
MS-P	257	339	596
MS-Q	94	160	254
MS-G	580	285	865

B

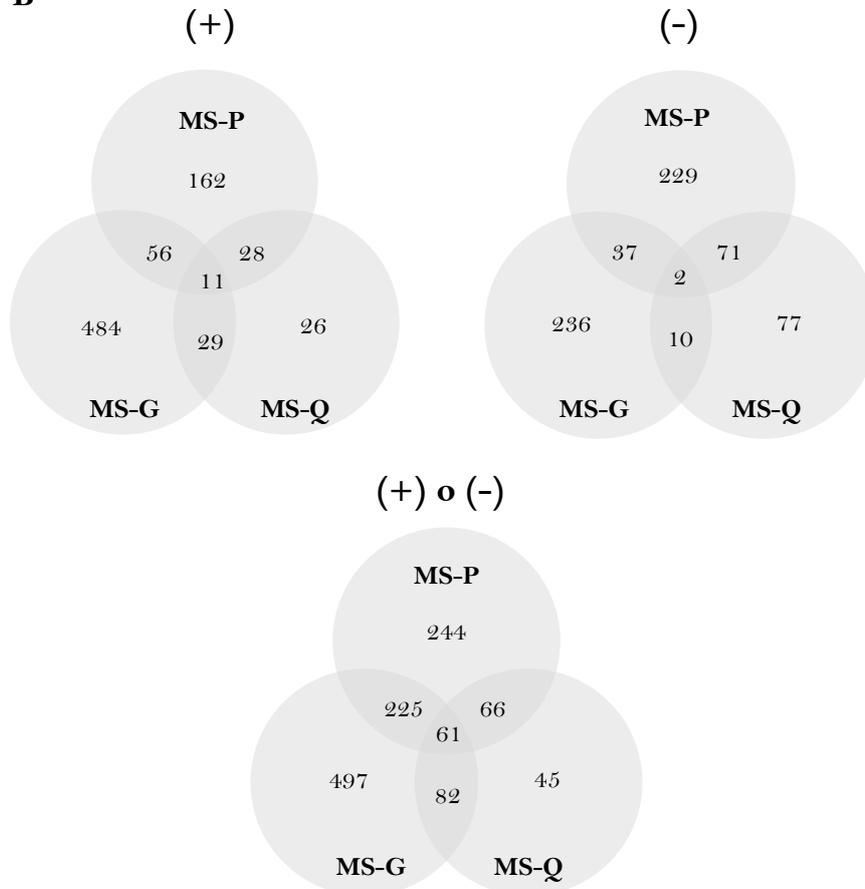


Figura 9. Datos globales de expresión de *T. harzianum* CECT 2413 obtenidos a partir de los *microarrays* analizados. A: Número de *sets* de sondas que mostraron cambios significativos en el nivel de expresión (*fold* >2; bien por encima + o por debajo -) en respuesta a la presencia de raíces de plantas de tomate (MS-P), quitina (MS-Q) o glucosa (MS-G) con respecto al medio basal (MS). B: Diagramas de Venn representando el número de *sets* de sondas con expresión diferencial significativa, específicos o comunes en cada condición. FDR, *False Discovery Rate*.

Con la finalidad de obtener un panorama general de los datos de expresión obtenidos en las diferentes condiciones experimentales ensayadas, se elaboró un *heat map* a partir de los 1.220 *sets* de sondas que mostraron cambios significativos de expresión ($fold > 2$) en al menos una condición experimental con respecto a la condición control (MS). Según se muestra en la **Figura 10A**, los *sets* de sondas de las dos réplicas biológicas de cada condición experimental exhibieron perfiles de expresión similares. Además, como puede observarse, la mayoría de los *sets* de sondas con expresión diferencial corresponderían a genes que se inducen en presencia de glucosa (grupo II del *heat map*, rojo oscuro). Por otra parte, los *sets* de sondas de los subgrupos Ia y Ib del *heat map* representarían genes reprimidos por glucosa pero inducidos en presencia de plantas de tomate (principalmente subgrupo Ia) o quitina (principalmente subgrupo Ib). Los *sets* de sondas correspondientes al subgrupo Ic representarían genes fuertemente expresados en presencia de plantas de tomate y débilmente en presencia de glucosa.

Como controles internos de los datos de expresión obtenidos, se localizaron en el *heat map* los *sets* de sondas correspondientes a genes conocidos de *T. harzianum* CECT 2413 que codifican para las tripsinas –PRA1 [EMBL: AJ249721] y P7480 (aquí referida como PRA2) [EMBL: AM294977]– y subtilisinas –P10261 (aquí referida como PRB1) [EMBL: AM294980] y P8048 (aquí referida como PRB2) [EMBL: AM294978]– cuya expresión se sabe que es inducida fuertemente en presencia de quitina y reprimida por glucosa (Suárez y col., 2007). Según se observa en la **Figura 10B** y de acuerdo con lo esperado, los seis *sets* de sondas representativos de estos genes se ubicaron en el subgrupo Ib y exhibieron perfiles de expresión comparables a los publicados previamente. Adicionalmente, los datos de expresión obtenidos en esta Tesis pusieron de manifiesto que estos genes apenas se expresan cuando *T. harzianum* se encuentra en presencia de plantas de tomate (**Figura 10B**). Estos resultados fueron corroborados mediante análisis *Northern blot*, observándose que el gen *pra1* se induce débilmente en presencia de plantas de tomate (MS-P), mientras que en el caso del gen *prb1*, no se detectó ARNm en esta condición (**Figura 11**).

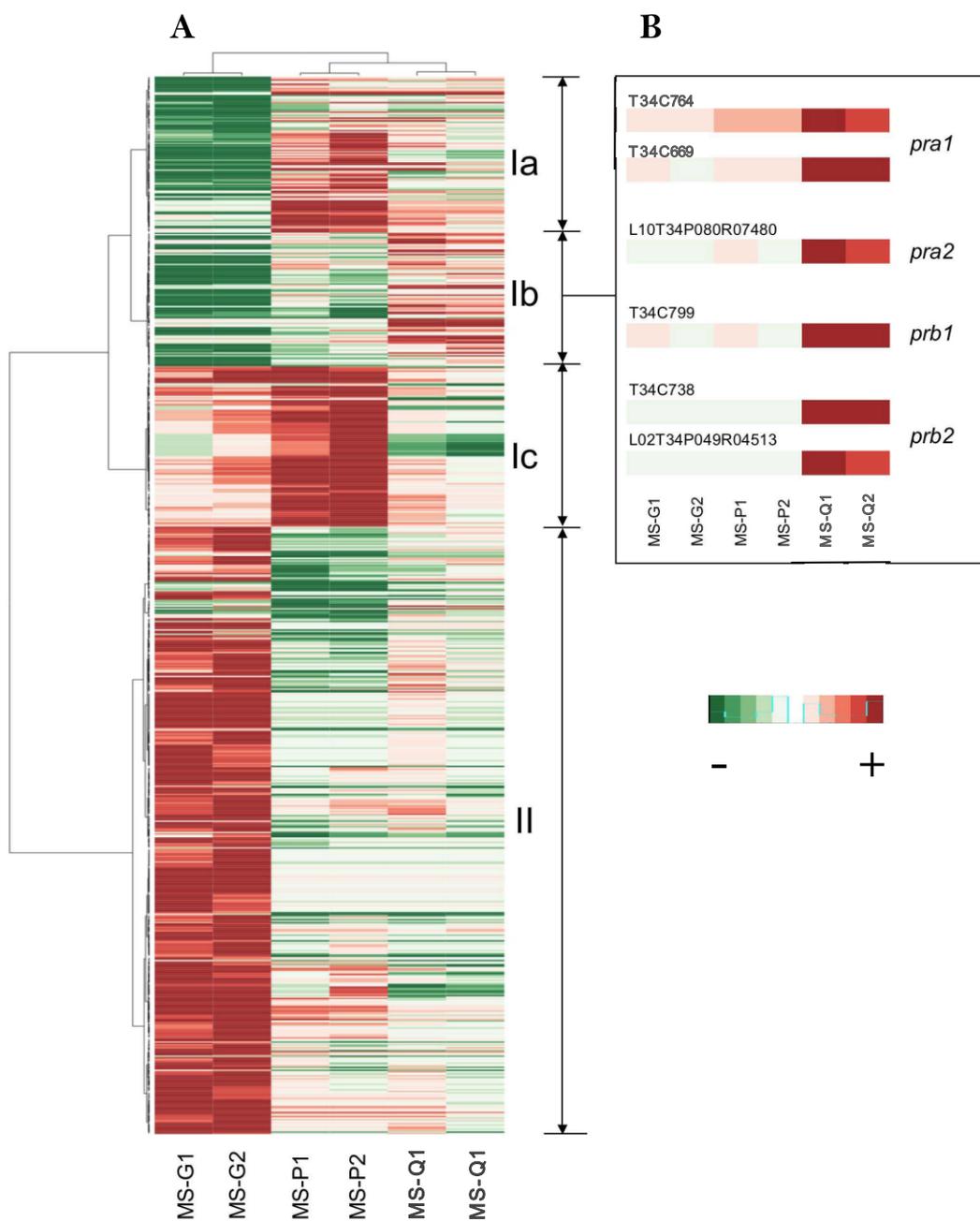


Figura 10. Heat map de los distintos perfiles de expresión de *T. harzianum* CECT 2413 obtenidos a partir de los *microarrays* analizados. A: Para el agrupamiento jerárquico se seleccionaron los 1.220 *sets* de sondas que mostraron cambios en el nivel de expresión superiores a dos veces ($fold > 2$; FDR; 0,23) en respuesta a la presencia de plantas de tomate (MS-P), quitina (MS-Q) o glucosa (MS-G), con respecto a la condición de referencia en medio basal (MS). Para cada condición experimental se realizaron dos réplicas biológicas (1 y 2), cada una proveniente de tres cultivos independientes. Los *sets* de sondas se ordenaron utilizando el test Kendall tau y el algoritmo de Ward en el entorno del programa informático R. Para cada fila se calculó el valor medio de expresión en la condición control MS y se sustrajo del valor de expresión en el resto de condiciones. Los colores rojo y verde representan cambios de expresión positivos (+) y negativos (-), respectivamente, con respecto a la condición control, siendo la intensidad del color proporcional a la magnitud de la expresión diferencial. B: Detalle de los perfiles de expresión correspondientes a los genes *pra1*, *pra2* (antes *p7480*), *prb1* (antes *p10261*) y *prb2* (antes *p8048*). Los perfiles de varios *sets* de sondas representando secuencias (*contigs* o *singlets*) de un mismo gen se muestran de manera independiente.

3. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE *T. harzianum* CECT 2413 INDUCIDOS DURANTE LA INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE

Dado que el presente trabajo de investigación tenía como objetivo la identificación de genes de *T. harzianum* CECT 2413 implicados en la interacción con plantas de tomate, se seleccionaron los 257 sets de sondas que exhibieron un aumento significativo en el nivel de expresión en MS-P vs. MS ($fold > 2$ y $FDR = 0,23$; material suplementario en Samolski y col., 2009; *additional file 3*) con objeto de llevar a cabo la anotación de las secuencias/genos correspondientes según la terminología y estructura jerárquica *Gene Ontology* (GO) (Ashburner y col., 2000). Así, mediante el programa Blast2GO (Gotz y col., 2008) y utilizando un valor $E < 10^{-5}$, se consiguió asignar categorías GO a 85 de las 257 secuencias examinadas, las cuales representaron un total de 46 genes diferentes (**Tabla 1**). Para otras 57 secuencias no se obtuvieron resultados durante el proceso de anotación (siendo la mayoría proteínas hipotéticas), y para las 115 secuencias restantes no se encontraron resultados significativos de similitud en las bases de datos.

Según los resultados obtenidos, aproximadamente el 45% de los genes inducidos en *T. harzianum* CECT 2413 en respuesta a la presencia de plantas de tomate son homólogos de genes que codifican proteínas implicadas en rutas metabólicas, principalmente enzimas asociadas al metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos, y también enzimas involucradas en la biosíntesis de vitaminas y cofactores, así como en procesos energéticos y de desintoxicación celular en otros organismos. Cabe destacar que algunos de estos genes (concretamente los que codifican para las siguientes proteínas: O-glicosil hidrolasa de la familia 2, aldosa 1-epimerasa, dihidroxiacetona quinasa, esfingomielina fosfodiesterasa, GTP ciclohidrolasa I, S-hidroxi metilglutación sintasa, acetilserotonin metiltransferasa), así como el correspondiente a un inhibidor de serin-proteasas, recayeron en la categoría funcional GO "crecimiento o desarrollo de un simbiote sobre o cerca de la superficie del hospedador", dado que sus homólogos en *Magnaporthe grisea* son expresados diferencialmente durante la formación de apresorios (Gowda y col., 2006).

Con relación a las proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos, se observó una mayor expresión de diversas enzimas de las rutas glucolítica/gluconeogénica, además de una fosfocetolasa de la ruta de las pentosas fosfato y una 1,3-beta-glucano sintasa implicada en la biosíntesis de pared celular.

También se encontraron genes de enzimas asociadas al metabolismo de lípidos: una fosfatidilserina sintasa, implicada en la biosíntesis de fosfolípidos; una dihidroxiacetona quinasa, implicada en el metabolismo del glicerol; y una esfingomielina fosfodiesterasa, responsable de la hidrólisis de la esfingomielina en fosfocolina y ceramida. Asimismo, también se expresaron diferencialmente enzimas asociadas al metabolismo de aminoácidos: una acetilornitina transaminasa, involucrada en el ciclo de la urea y en el metabolismo de los grupos amino; una 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, que cataliza la tercera reacción en el catabolismo de la fenilalanina y tirosina; y una acetilserotonin metiltransferasa, que participa en el metabolismo del triptófano. Por último, relacionada con el metabolismo de nucleótidos, se encontró una pirimidina 5'-nucleotidasa.

Además de los genes asociados a procesos metabólicos, también se observó una mayor expresión de genes implicados en procesos de señalización, transcripción y traducción, así como en modificaciones postraduccionales y plegamiento de proteínas, entre ellos se encontró el gen del factor de transcripción Pac1 (PacC) de *T. harzianum* CECT 2413 [EMBL: EF094462], responsable de regular la expresión génica por pH (Moreno-Mateos y col., 2007). Por otro lado, se encontraron genes cuyos homólogos participan en procesos de transporte celular, organización del citoesqueleto y de la pared celular.

Interesantemente, también se encontró aumento de expresión en un gen homólogo al que codifica para la proteína secretada rica en cisteína Sm1 [EMBL: DQ121133] /Epl1 [EMBL: CAL80754] en *T. virens*/*T. atroviride*, que interviene en la inducción de respuestas de defensa en plantas (Djonović y col., 2006, 2007; Seidl y col., 2006). El hecho de que este gen también se induzca en *T. harzianum* en nuestro estudio transcriptómico sostiene su rol durante la interacción *Trichoderma*-planta. Inesperadamente, otros genes descritos previamente en *T. harzianum* CECT 2413 con implicación en procesos de micoparasitismo, como los que codifican para la endoquitinasa CHIT42 [EMBL: S78423] (Carsolio y col., 1994; García y col., 1994), la tripsina PRA1 [EMBL: AJ249721] (Suárez y col., 2004), la proteasa aspártica P6281 (aquí referida como ASP1) [EMBL: AJ967001] (Suárez y col., 2005) y la proteína de pared celular QID74 [EMBL: X95671] (Rosado y col., 2007), mostraron también un aumento significativo en el nivel de expresión durante la interacción con plantas de tomate respecto a la condición de referencia en medio basal MS (**Tabla 1**), si bien, como puede observarse en la **Figura 11A**, los niveles de expresión de *chit42* y *pra1* en

MS-P son mucho menores que los de *asp1* y *qid74*. Con el objetivo de corroborar estos datos se llevaron a cabo análisis *Northern blot*. Como se observa en la **Figura 11B**, efectivamente tanto *asp1* como *qid74* mostraron una fuerte expresión en MS-P, mientras que los niveles de expresión de *chit42* y *pra1* apenas fueron detectables en esta condición.

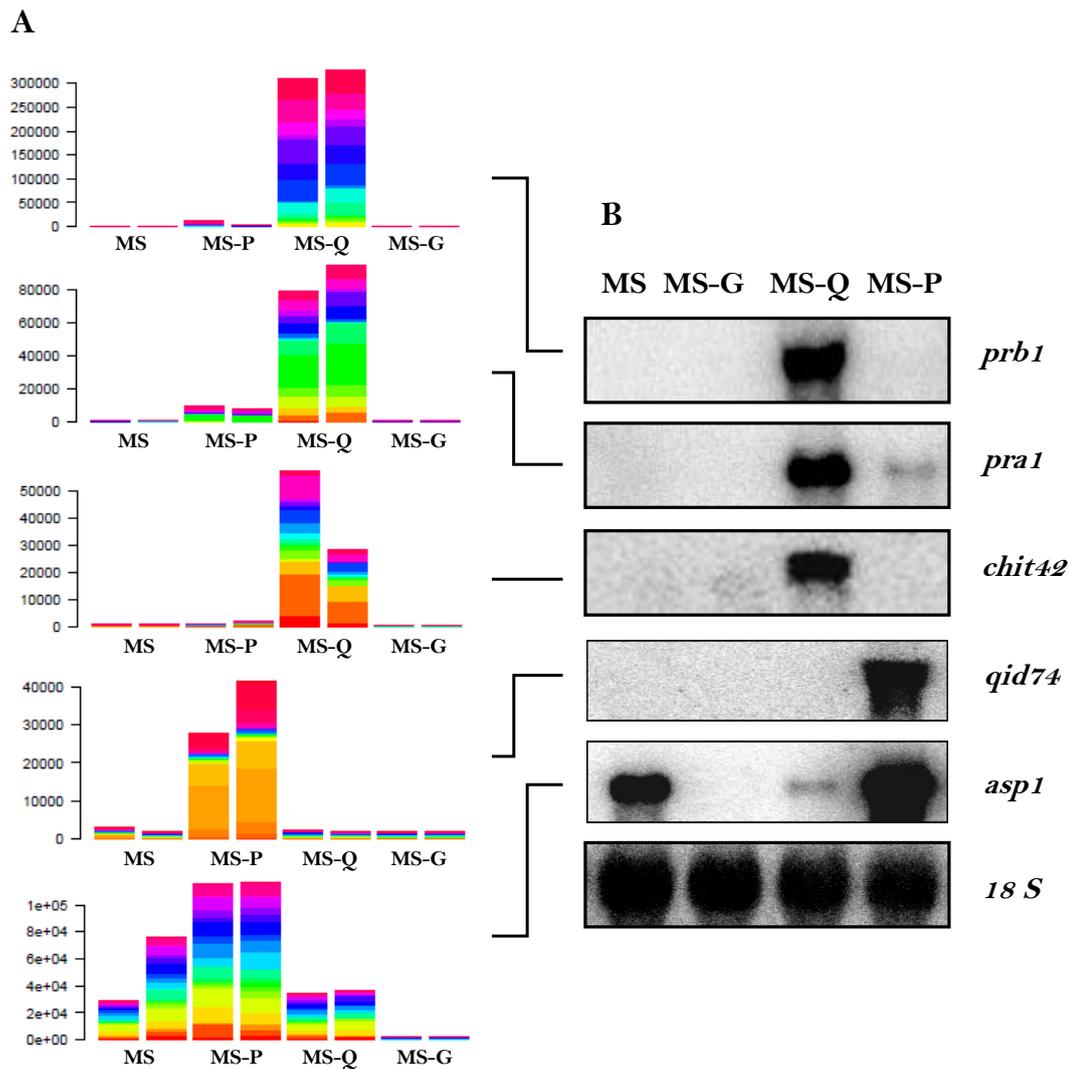


Figura 11. Análisis comparativo de la expresión de cinco genes de *T. harzianum* CECT 2413 en micelio cultivado en medio basal (MS); en medio basal suplementado con glucosa (MS-G) o quitina (MS-Q); en presencia de plantas de tomate (MS-P). A: Expresión determinada utilizando "Tricho-chips". B: Expresión mediante análisis tipo *Northern*. Cada carril contiene 30 μ g del mismo ARN empleado para hibridar los *microarrays* analizados en este estudio. Como sondas se utilizaron fragmentos de ADN específicos de cada gen amplificados con los oligonucleótidos universales T3 y T7 a partir de los correspondientes clones de una librería de ADNc. El marcaje se realizó con fósforo radiactivo (32 P). Control de carga: ADNr 18S.

Tabla 1. Lista de genes, distribuidos por categorías funcionales, inducidos en *T. harzianum* CECT 2413 en respuesta a la presencia de plantas de tomate.

CÓDIGO DE LA SECUENCIA ^{a, b}	DESCRIPCIÓN DEL BLAST <i>HIT</i> ^c	TÉRMINOS GO ^d	FOLD ^e		
			MS-P	MS-Q	MS-G
<i>Metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos</i>					
T34C721	O-glicosil hidrolasa familia 2	P:metabolismo de carbohidratos; P:crecimiento o desarrollo de un simbionte sobre o cerca de la superficie del hospedador	2,66	1,36	0,56
L52T3KP007R00584	O-glicosil hidrolasa hipotética familia 16	P:metabolismo de carbohidratos	2,01	1,15	3,13
L11T34P099R09379 (2)	Aldosa 1-epimerasa	P:metabolismo de carbohidratos; P:crecimiento o desarrollo de un simbionte sobre o cerca de la superficie del hospedador	2,61	0,91	0,04
L92S34P003R00259	Fosfocetolasa	P:metabolismo de carbohidratos; F:actividad liasa	2,23	2,51	1,37
L52T3KP015R01357	D-lactato deshidrogenasa	P:metabolismo de carbohidratos; P:desarrollo del micelio	2,31	1,29	1,22
L19T52P001R00233	D-lactato deshidrogenasa precursor mitocondrial	F:actividad oxidorreductasa; F:unión a flavín adenín dinucleótido (FAD)	2,82	1,67	6,01
L92S34P005R00458 (2)	Glucano sintasa	P:biosíntesis de 1,3-beta-glucano	2,90	1,08	0,35
L92S34P002R00160	Fosfatidilserina sintasa	P:biosíntesis de fosfolípidos; P:desarrollo del micelio	2,04	1,16	0,43
L52T3KP019R01759	Dihidroxiacetona quinasa	P:metabolismo de glicerol; P:crecimiento o desarrollo de un simbionte sobre o cerca de la superficie del hospedador	2,08	1,04	1,96
L03T34P070R06561	Esfingomielina fosfodiesterasa	F:actividad hidrolasa; P:crecimiento o desarrollo de un simbionte sobre o cerca de la superficie del hospedador	2,78	8,15	1,24
T34C611	Acetilornitina aminotransferasa	P:metabolismo de arginina; P:biosíntesis de aminoácidos	2,38	1,49	14,62
L19T52P002R00673 (2)	4-Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	P:catabolismo de tirosina; P:catabolismo de L-fenilalanina	2,17	5,11	1,67
L21T78P018R01683	Proteína tipo acetilserotonin metiltransferasa	P:crecimiento o desarrollo de un simbionte sobre o cerca de la superficie del hospedador	2,39	1,45	3,99
L10T34P076R07115	Pirimidina 5'-nucleotidasa	P:proceso metabólico; F:actividad catabólica	2,98	0,85	16,72
<i>Metabolismo energético</i>					
L03T34P070R06566 (9)	Inhibidor de ATPasa mitocondrial	F:actividad inhibidora de enzimas	2,73	1,81	0,65
L52T3KP010R00917	NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I familia Iyr)	F:actividad oxidorreductasa sobre NADH o NADPH; C:membrana interna mitocondrial	2,02	1,11	2,46

CÓDIGO DE LA SECUENCIA ^{a, b}	DESCRIPCIÓN DEL BLAST <i>HIT</i> ^c	TÉRMINOS GO ^d	FOLD ^e		
			MS-P	MS-Q	MS-G
<i>Metabolismo de vitaminas y cofactores</i>					
L51TP1P003R00220	GTP ciclohidrolasa I	P:biosíntesis de tetrahydrobiopterina; P:crecimiento o desarrollo de un simbionte sobre o cerca de la superficie del hospedador	2,10	1,19	1,60
L08T34P063R05860	Formil-tetrahidrofolato desformilasa	P:biosíntesis ' <i>de novo</i> ' de inosina monofosfato (IMP); P:desarrollo del micelio; F:actividad hidroximetil transferasa, formil transferasa y otras relacionadas	2,06	2,25	36,31
<i>Desintoxicación</i>					
estExt_fgenesH5_pg_C_220056	2-Nitropropano dioxigenasa	F:actividad oxidoreductasa	2,42	1,29	1,39
L06T34P032R03057	Dimetilalanina monooxigenasa	F:actividad oxidoreductasa	2,30	0,66	45,48
T34C36	Proteína con dominio RTA1	P:respuesta a estímulos	4,48	3,13	12,64
TSTC134	S-hidroximetilglutación sintasa	P:crecimiento o desarrollo de un simbionte sobre o cerca de la superficie del hospedador; F:actividad carbono-azufre liasa	2,05	1,07	2,04
<i>Señalización, transcripción y traducción</i>					
L51TP1P006R00499	Proteína mFLJ00348	P:cascada I-kappaB quinasa/NF-kappaB; F: unión	2,55	1,63	1,92
L02T34P018R01663	Efecto transcripcional	P:regulación de la transcripción dependiente de ADN	4,09	1,77	1,01
L03T34P074R06985*	Factor transcripcional (PacC)	F:unión	2,65	7,66	0,21
L03T34P059R05502	Proteína con repeticiones de pentatricopeptidos	F:unión a flavín mononucleótido (FMN); P:desarrollo del micelio	2,11	1,58	0,16
TSTC120	Fusión proteica ribosomal S30/ubiquitina	P:traducción	2,39	1,34	2,02
L53TP1P028R02620	Proteína L44 ribosomal 60S	P:traducción	2,22	1,21	2,08
L51TP1P002R00166	Proteína L40 ribosomal 60S	P:traducción	2,34	1,37	1,91
L02T34P066R06130 (2)	Proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)	P:traducción	2,06	1,75	2,85

CÓDIGO DE LA SECUENCIA ^{a, b}	DESCRIPCIÓN DEL BLAST <i>HIT</i> ^c	TÉRMINOS GO ^d	FOLD ^e		
			MS-P	MS-Q	MS-G
<i>Modificación postraduccional y plegamiento de proteínas</i>					
L55TSTP004R00316	Enzima conjugadora de ubiquitina	P:modificación postraduccional de proteínas	2,03	1,22	1,73
L51TP1P019R01734	Subunidad preplegamiento	P:plegamiento de proteínas	2,13	1,29	1,85
L54TP1P031R02884	Proteína con dominio TPR	F:unión a proteínas de choque térmico; P:desarrollo del micelio	2,08	1,21	1,24
<i>Transporte</i>					
L10T34P102R09645	Proteína mitocondrial transportadora de ornitina	P:transporte	3,02	2,64	13,62
L07T11P036R03403	Proteína mitocondrial transportadora de carnitina/acilcarnitina	P:transporte	2,15	1,59	2,11
TP1C33	Proteína de la membrana externa mitocondrial	P:transporte de proteínas	4,15	1,39	1,66
L02T34P012R01078	Proteína de la familia snf7	P:transporte de proteínas; P:desarrollo del micelio	2,74	3,10	0,71
<i>Citoesqueleto y pared celular</i>					
T34C109	Proteína tipo profilina	P:organización y biogénesis del citoesqueleto de actina	2,25	1,50	5,36
L50TH2P020R01889	Cadena pesada de dieniina	P:movimiento basado en microtúbulos	2,03	1,04	1,11
L20T59P001R00153	Hidrofobina clase II	P:crecimiento de hifas	2,09	0,10	0,86
<i>Interacción con el hospedador</i>					
L03T34P047R04348	Proteína Epl1	P:interacción con el hospedador; P:patogénesis	2,32	1,50	0,55
L02T34P100R09404*	Endoquitinasa 42	P:catabolismo de quitina	5,16	322,38	1,88
T34C669* (2)	Proteasa tipo tripsina (PRA1)	P:proteólisis	13,73	180,48	0,80
T34C294*	Proteasa aspártica (P6281)	P:proteólisis	2,24	0,73	0,02
L10T34P112R10010* (3)	Proteína Qid74	-	4,42	1,40	1,55
L50TH2P008R00685	Inhibidor de proteasas tipo Kazal I1	P:crecimiento o desarrollo de un simbionte sobre o cerca de la superficie del hospedador	2,03	1,08	1,16

CÓDIGO DE LA SECUENCIA ^{a, b}	DESCRIPCIÓN DEL BLAST <i>HIT</i> ^c	TÉRMINOS GO ^d	FOLD ^e		
			MS-P	MS-Q	MS-G
<i>Función desconocida</i>					
L07T11P033R03099 (27)	Proteína mitocondrial de función desconocida	C:mitocondria	2,53	1,03	1,71

^a Códigos de identificación de secuencias ESTs de *Trichoderma* spp. y transcritos deducidos del genoma de *T. reesei* QM6a cuyos *sets* de sondas reflejaron expresión diferencial significativa (*fold* > 2; FDR: 0,23) tras la hibridación del "Trichochip" con ADNc de *T. harzianum* CECT 2413 cultivado en presencia de plantas de tomate (MS-P) respecto a la condición control en medio MS basal. Los números de acceso de cada EST en la base de datos EMBL, así como las ESTs incluidas en cada *contig* se encuentran disponibles como material suplementario en Samolski y col. (2009) (*additional files* 6 y 7, respectivamente). Las secuencias de *T. reesei* están disponibles en el portal del *DOE Joint Genome Institute* (JGI) (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>).

^b Los números entre paréntesis indican redundancia (número de secuencias que tienen el mismo BLAST *hit*).

^c Resultados del análisis BLAST utilizando un valor $E < 10^{-5}$ como indicativo de significancia.

^d Categorías funcionales GO: proceso biológico (P), función molecular (F) y componente celular (C); inferidas tras la anotación con el programa Blast2GO. Información adicional acerca del proceso de anotación se encuentra disponible como material suplementario en Samolski y col. (2009) (*additional file* 4).

^e *Fold* se refiere al nivel de expresión en presencia de plantas de tomate (MS-P), quitina (MS-Q) o glucosa (MS-G) respecto a la condición de referencia (medio basal MS).

* Secuencia correspondiente a un gen conocido de la cepa *T. harzianum* CECT 2413.

DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo con el doble propósito de cubrir la ausencia de *micorarrays* comerciales para *Trichoderma* spp. mediante la construcción de un *microarray* de alta densidad de oligonucleótidos útil para distintas especies del género, así como de aplicar esta herramienta para explorar por primera vez la respuesta transcriptómica de una cepa de control biológico (*T. harzianum* CECT 2413) bajo distintas condiciones de cultivo, incluyendo la interacción temprana (9 h) con plantas. Anteriormente, el estudio del transcriptoma de *Trichoderma* spp. durante la interacción con plantas se había abordado mediante el uso de *macroarrays* (Bailey y col., 2006; Chacón y col., 2007). Sin embargo, por un lado, el número de secuencias de transcritos representadas en estos *macroarrays* es relativamente limitado en comparación con la gran capacidad de los *microarrays* de alta densidad de oligonucleótidos; y, por otro lado, la reproducibilidad y sensibilidad que ofrecen los *macroarrays* suele ser mucho menor. Al inicio de esta Tesis, se habían utilizado *microarrays* de ADNc (Chambergo y col., 2002; Bonaccorsi y col., 2006; Rosales-Saavedra y col., 2006) y de oligonucleótidos (Foreman y col., 2003) para el estudio de transcriptomas de *T. reesei* y *T. atroviride*, pero en ningún caso se habían aplicado al conocimiento de procesos relacionados con el control biológico.

El *microarray* para especies de *Trichoderma* desarrollado en este trabajo recibió el nombre de "Trichohip" y quedó finalmente constituido por 384.659 sondas que representan un total de 23.211 secuencias (ESTs o transcritos deducidos) de 13 cepas pertenecientes a 9 especies distintas, entre ellas 3.826 secuencias ESTs de *T. harzianum* CECT 2413 (**Figura 7**). A pesar de la redundancia característica de las librerías de ESTs, si tenemos en cuenta que los genomas de *Trichoderma* spp. secuenciados hasta el momento contienen un número estimado de genes comprendido entre 9.129 y 14.095 (Grigoriev y col., 2012; Studholme y col., 2013), cabe esperar que los 3.826 *sets* de sondas incluidos en el "Trichohip" para la cepa *T. harzianum* CECT 2413 representen de manera sustancial el transcriptoma de dicha cepa. Además, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que los *sets* de sondas diseñados a partir de secuencias de otras cepas de *Trichoderma*, diferentes a *T. harzianum* CECT 2413, también fueron útiles para obtener información acerca de la expresión génica de la misma. Concretamente, se encontró que cerca de la mitad de los *sets* de sondas que mostraron cambios significativos en su nivel de expresión tras la hibridación con ADNc de *T. harzianum* CECT 2413, se habían diseñado a partir de secuencias de otras cepas o

especies de *Trichoderma*. Por otra parte, el hecho de que genes conocidos de *T. harzianum*, como los que codifican para las proteasas PRA1, PRA2, PRB1 y PRB2 y la endoquitinasa CHIT42 (Carsolio y col., 1994; García y col., 1994; Suárez y col., 2007), hayan mostrado en nuestro estudio el patrón de expresión esperado, y que el homólogo del gen *Sm1* de *T. virens* (discutido más adelante) también haya mostrado un aumento en su nivel de expresión en nuestro sistema de interacción *T. harzianum*-planta, valida los resultados obtenidos y proporciona un alto grado de confianza en el "Trichohip" desarrollado, en cuanto a su capacidad para detectar genes con expresión diferencial.

Globalmente, los resultados obtenidos tras la hibridación de los 8 "Trichohips" indicaron que los cambios que ocurren en la expresión génica de *T. harzianum* durante su crecimiento en presencia de glucosa con respecto al medio mínimo (condición de referencia) son relativamente mayores (muchos *sets* de sondas exhibieron cambios de expresión y muchos de ellos exhibieron los cambios más notables) que los cambios que ocurren durante su crecimiento en contacto con raíces de tomate y estos, a su vez, son relativamente mayores que los que ocurren durante su crecimiento en presencia de quitina como única fuente de carbono, resultados que podrían relacionarse con la disponibilidad de nutrientes en cada uno de los medios de cultivo. En este sentido, el alto número de *sets* de sondas con aumento de expresión en presencia de glucosa (580 vs. 257 en plantas de tomate, y 94 en quitina), podría relacionarse con la intensa actividad metabólica esperada para un hongo filamentoso durante su crecimiento en un medio rico con un sustrato fácilmente asimilable (Chambergo y col., 2002).

El presente estudio permitió identificar 47 genes inducidos en el micelio de *T. harzianum* CECT 2413 en contacto con raíces de plantas de tomate, de los cuales una gran parte recayeron en categorías GO relacionadas con el metabolismo, incluyendo actividades anabólicas y catabólicas, resultado que indica una adaptación activa del hongo al nicho rizosférico durante la asociación simbiótica. La activación masiva de genes implicados en procesos metabólicos durante la interacción *Trichoderma*-planta sugiere una intensificación en la adquisición y movilización de nutrientes necesarios, no solo para sustentar el crecimiento fúngico, sino para mantener la integridad de membranas y paredes celulares, así como para la reorganización de las mismas durante la formación de estructuras de penetración, como parte de la respuesta adaptativa del hongo a la rizosfera. Por otro lado, la activación masiva de genes implicados en procesos metabólicos también ha sido descrita en *T. atroviride* durante la interacción micoparasítica con *Rhizoctonia solani* (Reithner y col., 2011), lo que lleva a pensar que

tanto el establecimiento de asociaciones simbióticas mutualistas como micoparasíticas supone una alta demanda energética en *Trichoderma* spp. Cabe destacar que seis de los genes identificados en nuestro estudio (los que codifican para una aldosa 1-epimerasa, una esfingomielina fosfodiesterasa, una O-glicosil hidrolasa de la familia 2, una dihidroxiacetona quinasa, una proteína tipo acetilserotonin metiltransferasa y una GTP ciclohrolasa I) tienen alta similitud con genes expresados diferencialmente en el hongo fitopatógeno *M. grisea* durante la formación de estructuras de penetración (apresorios) en la planta (Gowda y col., 2006). La **aldosa 1-epimerasa** (galactomutarotasa) es una enzima responsable de la interconversión anomérica de la D-glucosa y otras aldosas durante el metabolismo normal de las mismas (Poolman y col, 1990), y cuya actividad en *H. jecorina* está ligada con la proteína fúngica GAL10 que participa en el metabolismo de la galactosa asociado al proceso de regeneración de la pared celular (Seiboth y col., 2002; Hartl y col., 2007). La **esfingomielina fosfodiesterasa** es la principal responsable de la síntesis de ceramida en respuesta a estreses celulares (Hannun y Obeid, 2002), y se sabe que contribuye al crecimiento polarizado de las hifas de *Aspergillus fumigatus* (Li y col., 2006). **Las glicósido hidrolasas** agrupan la mayor cantidad y diversidad de enzimas activas sobre los sustratos presentes en las paredes celulares vegetales como la celulosa, hemicelulosa y lignina (Murphy y col., 2011). Entre los productos génicos inducidos en *T. harzianum* CECT 2413 con plantas de tomate durante la interacción, además de una glicosil hidrolasa perteneciente a la familia 2 (que comprende enzimas con actividad beta-galactosidasa, beta-manosidasa y beta-glucuronidasa, entre otras), se encontró una glicosil hidrolasa de la familia 16 (que comprende enzimas con actividad liquenasa, xiloglucanasa, endo-beta-1,3-glucanasa y endo-beta-1,4-galactosidasa, entre otras). En especies endofitas como *T. hamatum* y *T. ovalisporum* también se ha encontrado la inducción de glicosil hidrolasas pertenecientes a las familias 2 y 7 durante la interacción con plantas de cacao (Bailey y col., 2006). En este sentido, la inducción en *Trichoderma* spp. de estas enzimas durante su crecimiento en contacto con raíces vegetales apunta hacia la necesidad de hidrolizar el tejido radical para el establecimiento de la asociación simbiótica. Asimismo, los productos de dicha hidrólisis podrían servir como una fuente de nutrientes para satisfacer la demanda energética del hongo durante la interacción. **La dihidroxiacetona quinasa**, es una enzima que fosforila la dihidroxiacetona en la ruta de degradación del glicerol que, aunque no es común en hongos, se ha descrito en algunas especies de levadura como una ruta alternativa activada bajo condiciones de estrés osmótico (Norbeck y Blomberg, 1997;

Wang y col., 2002). Normalmente, bajo estas condiciones la célula acumula glicerol con el fin de recuperar la turgencia perdida y la dihidroxiacetona quinasa participa en la regulación de su concentración. En *M. grisea* se ha descrito que durante la formación de apresorios se produce una acumulación de altas concentraciones de glicerol con el fin de generar la turgencia necesaria para que el hongo pueda penetrar el tejido vegetal (Thines y col., 2000). Dado que algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de formar estructuras tipo apresorios para penetrar y colonizar el tejido vegetal (Yedidia y col., 2000; Bailey y col., 2009), la inducción de este gen en *T. harzianum* CECT 2413 durante la interacción con plantas de tomate también podría relacionarse con la regulación de los niveles de glicerol acumulados tras la formación de este tipo de estructuras de penetración. Por último, la **acetilserotonin metiltransferasa** es una enzima responsable de la síntesis de melatonina a partir de serotonina; y la **GTP ciclohidrolasa I** participa en la producción de tetrahidrofolato –coenzima implicada en la síntesis de ácidos nucleicos y metionina– y en la producción de tetrahidrobiopterina (Wang y col., 2011) –cofactor esencial para la conversión de L-triptófano a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) y para la síntesis de óxido nítrico (NO)–. El 5-HTP es un hidroxiaminoácido que sirve como precursor de la síntesis de serotonina y melatonina en plantas y animales (Murch y col., 2000). La inducción de una GTP ciclohidrolasa I en *T. harzianum* también podría relacionarse con la acumulación de melatonina durante la interacción temprana con plantas. Es posible que la serotonina y melatonina, gracias a sus potentes propiedades antioxidantes (Arnao, 2014; Ramakrishna y col., 2011), sean capaces de proteger al hongo del estrés oxidativo que sufre durante el proceso de colonización de las raíces vegetales. Alternativamente, es posible que la serotonina y la melatonina producidas por *T. harzianum* sean unas de las moléculas responsables del efecto protector frente a estreses abióticos que ofrecen ciertas especies de *Trichoderma* a los cultivos. Más aún, existen evidencias de que estas moléculas pueden actuar como reguladores del crecimiento y desarrollo de las plantas (Pelagio-Flores y col., 2011, 2012), lo que podría relacionarse con la capacidad de *Trichoderma* spp. de promover el crecimiento de los cultivos. Con relación al NO, esta es una molécula señalizadora asociada con diversas rutas de transducción de señales en mamíferos y plantas y que en hongos filamentosos tiene efecto regulador sobre la fotoconidiación y germinación de conidios (Ninnemann y Maier, 1996; Wang y Higgins, 2005). Otro de los genes con aumento de expresión en nuestro estudio, que sugiere que *T. harzianum* puede producir NO durante las primeras etapas de su interacción con plantas de tomate, es el que

codifica para una **acetilornitina aminotransferasa**, que es una enzima dependiente de piridoxal fosfato implicada en la biosíntesis de arginina. Este aminoácido no solo es importante para la biosíntesis de proteínas sino también para el almacenamiento de nitrógeno y la biosíntesis de NO. Así, en el hongo filamentoso *Coniothyrium minitans* se encontró que la L-arginina es un aminoácido esencial para la conidiación, posiblemente por medio de un proceso mediado por NO (Gong y col., 2007). Alternativamente, el NO producido por *T. harzianum* podría actuar como un regulador clave en procesos de desarrollo y defensa de las plantas (Fernández-Marcos y col., 2011).

Otros once genes inducidos en *T. harzianum* CECT 2413 por la presencia de plantas de tomate también sugieren un crecimiento y desarrollo activo del hongo durante el establecimiento de la asociación simbiótica. Entre ellos, dos genes que codifican para **D-lactato deshidrogenasas**, enzimas que modulan el flujo del piruvato cuando se requiere glucosa para el desarrollo de las hifas (LéJohn, 1971), y cuya actividad durante la interacción *Trichoderma*-planta podría permitirle al hongo evadir respuestas de defensa de la planta, como la producción de NO (Hong y col., 2008, Wendehenne y col., 2004), puesto que se sabe que dicha enzima permite mantener el balance redox durante el estrés nitrosativo generado por el hospedador frente al ataque de un patógeno (Richardson y col., 2008); una **glucano sintasa**, enzima clave para la biosíntesis de la pared celular en hongos (Latgé, 2007), cuya inducción puede correlacionarse con los resultados del estudio proteómico llevado a cabo por Marra y col. (2006), quienes describieron la inducción de una quitina sintasa (enzima implicada en la síntesis de pared celular tras el sometimiento a estreses químicos, físicos u osmóticos) en *T. atroviride* durante su interacción con hojas de alubia; una **fosfatidilserina sintasa**, enzima que participa en la síntesis y mantenimiento de la membrana celular fúngica a través del metabolismo del CDP-diacilglicerol (Carman y Han, 2009; Chen y col, 2010), cuya inducción podría relacionarse con el mantenimiento de la integridad de las paredes celulares como consecuencia del daño celular sufrido durante la interacción con la planta (Jung y Levin, 1999); una **formil-tetrahidrofolato desformilasa**, enzima implicada en el metabolismo de pequeñas moléculas y síntesis de ADN, que ha sido relacionada con las etapas tempranas de las asociaciones simbióticas entre microorganismos y plantas (Zhang y Chen, 2006) y cuya inducción también se detectó en otro estudio en *T. harzianum* en contacto con plantas de tomate (Chacón y col., 2007); una **proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)**, que presenta actividad chaperona y que tanto en hongos, plantas y mamíferos está

implicada en importantes procesos del crecimiento, como la proliferación mitótica durante las etapas tempranas de la diferenciación celular, la progresión del ciclo celular, así como en la protección celular frente a diversos tipos de estrés (Berkowitz y col., 2008; Bommer, 2012; Oh y col., 2013).

Durante la interacción de *T. harzianum* CECT 2413 con plantas de tomate también detectamos la inducción de una **hidrofobina** perteneciente a la clase II. Los genes que codifican para este tipo de hidrofobinas se encuentran expandidos en los genomas de *Trichoderma* spp. con respecto a otros ascomicetos, lo cual se ha relacionado con la capacidad de ciertas especies de este género para adherirse a la superficie de un amplio rango de hospedadores (Kubicek y col. 2008; Lorito y col., 2010). En *Trichoderma* spp., las hidrofobinas están implicadas en la hidrofobicidad superficial del hongo (Lora y col., 1995), en el desarrollo de las hifas y formación de conidios (Muñoz y col., 1997; Askolin y col., 2005; Mendoza-Mendoza y col., 2007), así como en procesos relacionados con la interacción con plantas, tal es el caso de la hidrofobina TasHyd1 de *T. asperelloides*, que participa en el proceso de colonización de raíces de plantas de pepino (Viterbo y Chet, 2006), y de una hidrofobina de *T. atroviride* implicada en la interacción con raíces de plantas de alubia (Marra y col., 2006). Otro gen relacionado con la adherencia a superficies hidrofóbicas que mostró una mayor expresión en respuesta al crecimiento de *T. harzianum* CECT 2413 en contacto con raíces de plantas de tomate fue **gid74**. Se ha propuesto que este gen, que codifica para una proteína de pared celular (Rey y col., 1998), participa en la adherencia celular a la superficie de hospedadores fúngicos, así como en la protección celular frente a las toxinas producidas por estos durante la interacción micoparasítica (Rosado y col., 2007), si bien nuestros resultados de expresión apuntan hacia un rol adicional en la interacción temprana *Trichoderma*-planta (ver Capítulo II de esta Memoria).

Finalmente, se encontró otro gen asociado con la interacción con el hospedador cuya inducción en *T. harzianum* CECT 2413 en contacto con raíces vegetales podría relacionarse con la activación de respuestas de defensa en las plantas. Se trata del homólogo del gen que codifica para la proteína **Sm1/Epl1** en *T. virens*/*T. atroviride*, perteneciente a la familia de las ceratoplataninas –proteínas de pequeño tamaño, secretadas y ricas en cisteínas con puentes disulfuro, que pueden actuar como proteínas efectoras en procesos fitopatogénicos o como inductoras de defensa en plantas (Pazzagli y col., 2014)– implicada en la inducción respuestas de defensa tanto a nivel local como sistémico (Djonović y col., 2006, 2007). Además, se detectó la inducción de

un gen que codifica para un **inhibidor de serin-proteasas del tipo Kazal I1**, y que sugiere la activación de mecanismos de "contradefensa" (ETI) a los que podría recurrir *T. harzianum* durante las primeras etapas del proceso de colonización del tejido radical con objeto de protegerse de los metabolitos tóxicos producidos por la planta como parte de su respuesta de defensa, y garantizar así el establecimiento de la asociación simbiótica. En el oomiceto *Phytophthora infestans* se ha descrito que la actividad de este tipo de inhibidores es capaz de inhibir la acción de proteasas secretadas por la planta para restringir la invasión del hongo (Tian y col., 2005). El aumento en el nivel de expresión del gen que codifica para una **nitropropano dioxigenasa**, enzima implicada en la defensa fúngica contra nitroalcanos secretados por la planta (Daubner y col., 2002), también sugiere que *T. harzianum* CECT 2413 es capaz de protegerse del efecto de compuestos tóxicos de origen vegetal. Algunos otros genes inducidos en *T. harzianum* CECT 2413, que también podrían estar potencialmente relacionados con procesos de desintoxicación, son los que codifican para una **dimetilanilina monooxigenasa**, que es una flavoproteína de amplio espectro capaz de actuar sobre diversos sustratos, incluyendo alcaloides de origen vegetal (Naumann y col., 2002); una **proteína con dominio RTA1** perteneciente a una familia compuesta por proteínas involucradas en la resistencia a sustancias tóxicas (Soustre y col., 1996); y una **S-hidroximetilglutación sintasa**, que podría estar implicada en el consumo del formaldehído citotóxico resultante de diversas reacciones de desmetilación (Pócsi y col., 2004).

En definitiva, el *microarray* multiespecies desarrollado en este trabajo nos ha permitido identificar diversos genes potencialmente implicados en la respuesta transcripcional de *T. harzianum* CECT 2413 durante las primeras horas de interacción con raíces de plantas de tomate (Samolski y col., 2009), dos de los cuales (*qid74* y *asp1*) son estudiados en los Capítulos II y III de esta Memoria. Muchos de los genes encontrados no habían sido previamente relacionados con la interacción *Trichoderma*-planta, incluyendo genes relacionados con la biosíntesis de óxido nítrico, serotonina y melatonina, desintoxicación de compuestos tóxicos y xenobióticos, actividades micoparasitarias, desarrollo del micelio o aquellos asociados con la formación de estructuras de infección de tejidos vegetales, que pueden, por tanto, proporcionar una nueva visión de los procesos que hacen posible el establecimiento de la asociación simbiótica con la planta y de las funciones que desempeña el hongo en dicha asociación. Nuestro entendimiento actual sobre la interacción *Trichoderma*-planta podría

considerarse tan solo la punta del iceberg, por lo que muchos más mecanismos y factores moleculares están todavía por definir y ser validados experimentalmente.

La efectividad del "Trichochip" para detectar genes expresados diferencialmente en *T. harzianum* bajo diversas condiciones de crecimiento pone de manifiesto la utilidad de esta herramienta para llevar a cabo estudios transcriptómicos. En futuros trabajos se podría abordar el estudio de diferentes etapas del proceso de colonización de la planta, así como el análisis de expresión de otras especies de *Trichoderma* representadas en el *microarray* e, incluso, de especies no incluidas en el mismo. Además, hoy en día es posible construir versiones mejoradas de este *microarray*, gracias a la reciente liberación de los genomas completos de otras siete especies de *Trichoderma* (Grigoriev y col., 2012; Studholme y col., 2013; Xie y col., 2014), y a la disponibilidad de *microarrays* de mayor densidad que aseguran la cobertura de genomas completos. De hecho, recientemente se ha construido una segunda versión del "Trichochip" añadiendo secuencias de transcritos deducidos del genoma de *T. virens* Gv29-8. Esta versión ha sido utilizada con éxito para el análisis de la respuesta transcriptómica de cuatro especies de *Trichoderma* (*T. harzianum* CECT 2413, *T. virens* Gv29-8, *T. hamatum* IMI 224801 y *T. parareesei* IMI 113135) durante su interacción con plantas de tomate (Rubio y col., 2012; 2014).

Capítulo II. Caracterización funcional del gen *qid74*
de *T. harzianum* CECT 2413.

INTRODUCCIÓN

Como se ha mostrado en los resultados del capítulo anterior, el análisis de la respuesta transcriptómica de la cepa *T. harzianum* CECT 2413 en presencia de plantas de tomate permitió la identificación de numerosos genes inducidos durante las primeras horas de interacción *Trichoderma*-planta. Entre estos genes se encuentra *qid74*, cuya expresión aumentada en estas condiciones generó un interés particular ya que este gen se había relacionado previamente con la interacción *Trichoderma*-hongo fitopatógeno (Rey y col., 1998; Rosado y col., 2007), pero nunca, hasta esta Tesis, con la interacción *Trichoderma*-planta.

El gen *qid74* de *T. harzianum* CECT 2413 codifica una proteína de pared celular de 704 aa rica en cisteína, que se encuentra conservada en otras especies del género *Trichoderma* (Rey y col., 1998). Qid74 fue descrita por su inesperada homología con la proteína salival BR3 del díptero *Chironomus tentans*, codificada por un gen perteneciente a la familia multigénica denominada *Balbani ring*, ubicada en un cromosoma politénico (cromosoma que experimenta rondas sucesivas de replicación de ADN sin división celular). Los genes *BR* se sitúan concretamente en un gran *puff* cromosómico, que consiste en una región desenrollada del cromosoma con alta actividad transcripcional que se ve reflejada en altos niveles de secreción proteica (Wieslander, 1994). Al no encontrarse indicios del gen *qid74* en organismos relacionados con *Trichoderma* spp. como el hongo *Gibberella fujikuroi* (teleomorfo de *Fusarium verticillioides*) o la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, inicialmente se sugirió que este podía haber surgido *de novo* en el género *Trichoderma*, y que su presencia en el reino *Fungi* y en el reino *Animalia* parecía constituir, *a priori*, un caso de evolución convergente (Rey y col., 1998). Sin embargo, posteriormente se concluyó que este no era un ejemplo correcto de evolución convergente de genes, ya que la proximidad de las secuencias de BR3 y Qid74 no era precisamente en las regiones codificantes sino en las secuencias repetitivas no codificantes, a partir de las cuales cada gen había surgido de manera independiente. En efecto, al comparar la secuencia de Qid74 con otras secuencias disponibles hoy en día en las bases de datos, se ha encontrado que presenta mayor similitud con algunas proteínas hipotéticas de diferentes especies de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, así como con proteínas hipotéticas de diversos miembros del reino animal, como cefalocordados, ascidias, moluscos, nematodos, peces, anfibios, aves y mamíferos.

capaces de inducir en plantas resistencia sistémica frente a enfermedades (Djonović y col., 2006; Seidl y col., 2006).

Teniendo en cuenta que el gen *qid74* se ha relacionado con la adherencia de *T. harzianum* a superficies hidrofóbicas, así como con procesos de protección celular (Rosado y col., 2007), el hecho de que hayamos encontrado que la expresión de este gen aumenta en presencia de plantas de tomate (Capítulo I de esta memoria; Samolski y col., 2009) lleva a pensar que podría participar en alguna de las diferentes etapas del proceso simbiótico que se da entre las especies de *Trichoderma* y las plantas. Por ejemplo, podría mediar la adherencia fúngica sobre la superficie de las raíces y, a su vez, la colonización de las mismas gracias a la capacidad que le conferiría al hongo para protegerse frente a los compuestos tóxicos producidos por las plantas durante la interacción. En este contexto, en el presente capítulo se aborda el estudio funcional del gen *qid74*, con especial énfasis en la relación íntima que establece el hongo con las raíces de tomate y pepino desde el punto de vista de la competencia rizosférica. Para ello, se evalúan las propiedades y comportamiento de la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 en comparación con cepas que carecen del gen *qid74* (*QIDΔ1*, *QID74Δ2*) y cepas que sobreexpresan dicho gen (*QID74T1*, *QID74T2*). Estas cepas fueron proporcionadas por el grupo de la Dra. Tahía Benítez (Universidad de Sevilla).

RESULTADOS

1. ENSAYOS DE HIDROFOBICIDAD

Con objeto de estudiar la posible participación de la proteína Qid74 en la hidrofobicidad del micelio de *T. harzianum* CECT 2413, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos comparando la cepa silvestre con las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2.

Por un lado, se evaluó la hidrofobicidad superficial de las hifas de cada cepa depositando gotas de 100 μL de agua sobre las colonias fúngicas en crecimiento vegetativo, según se describe en el apartado 10.1.1 de Materiales y Métodos. En ninguna de las cepas analizadas se observó la absorción de las gotas por parte del micelio, sino que estas permanecieron intactas mostrando, aparentemente, el mismo ángulo de contacto con la superficie del hongo (ejemplo en la **Figura 14A**). Este resultado indicaba que el micelio de la cepa silvestre era hidrofóbico y que presentaba el mismo grado de hidrofobicidad tanto en ausencia de *qid74* como cuando el gen está sobreexpresado.

Por otro lado, se evaluó la capacidad del micelio de cada cepa para romper la interfase líquido-aire, o lo que es lo mismo, para escapar de un ambiente hidrofílico (agua) a uno hidrofóbico (aire). Para ello se depositaron gotas de medio líquido de cultivo MM, conteniendo esporas de la cepa correspondiente, en el fondo de placas Petri, las cuales se incubaron durante 96 h para permitir la germinación y el crecimiento del hongo (ejemplo en la **Figura 14B**). A las 24 h de incubación se observó que las esporas de todas las cepas ensayadas fueron capaces de germinar y crecer dentro de la gota (ejemplo en la **Figura 14C**). A las 72 h de incubación todas las gotas mostraron una apariencia cóncava, notándose un colapso en el centro de las mismas (ejemplo en la **Figura 14D**). Finalmente, a las 96 h se pudo observar que las hifas de todas las cepas ensayadas habían sido capaces de romper la tensión superficial de la gota y de crecer fuera de esta sin formar micelio aéreo, permaneciendo en contacto con la superficie de la placa (ejemplo en las **Figuras 14E y 14F**).

El hecho de que en ambos ensayos, tanto la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 como las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2, mostraran el mismo comportamiento indicaba que la delección o la sobreexpresión del gen *qid74* no parecía afectar al carácter hidrofóbico del micelio de este hongo.

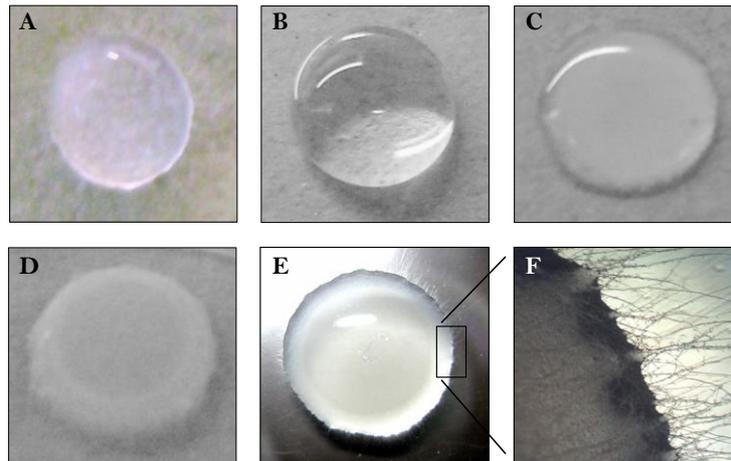


Figura 14. Imágenes representativas de los ensayos de hidrofobicidad del micelio de cepas de *T. harzianum*. A: Ensayo de hidrofobicidad superficial donde se evalúa la absorción de gotas de agua (100 μ L) depositadas sobre la superficie de micelio vegetativo durante 48 h (ensayo descrito en el apartado 10.1.1 de Materiales y Métodos). B-F: Ensayo de ruptura de la interfase líquido-aire donde se evalúa la capacidad de las hifas para romper la tensión superficial de gotas de medio líquido MM, y para emerger y crecer sobre las gotas (ensayo descrito en el apartado 10.1.2 de Materiales y Métodos). Imágenes de gotas de medio líquido MM tomadas a las 0 h (B), 24 h (C), 74 h (D) y 96 h (E y F).

2. ENSAYOS DE PROTECCIÓN CELULAR: RESISTENCIA A COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS

Con objeto de evaluar el papel propuesto para la proteína Qid74 de *T. harzianum* CECT 2413 en procesos de protección celular (Rosado y col., 2007), se analizó la resistencia de la cepa silvestre y de las cepas QID74 Δ 1, QID74 Δ 2, QID74T1 y QID74T2 frente a tres tipos de agentes antifúngicos: (i) enzimas líticas secretadas por la propia cepa silvestre (autoprotección celular), (ii) compuestos tóxicos secretados por plantas y (iii) fungicidas químicos.

(i) Para llevar a cabo el ensayo de autoprotección celular se recogieron los sobrenadantes de cultivo de la cepa silvestre tras 24 h de crecimiento en condiciones en las que se induce la secreción de numerosas enzimas líticas (presencia de paredes celulares fúngicas o de paredes celulares vegetales; apartado 4.6 de Materiales y Métodos).

Las proteínas presentes en estos sobrenadantes de cultivo se concentraron según se describe en el apartado 8.1 y se utilizaron para evaluar su efecto antifúngico sobre la germinación de esporas y el crecimiento de las germíulas de las distintas cepas de *Trichoderma* en estudio.

El perfil de proteínas secretadas por *T. harzianum* en cada condición de cultivo se muestra en la **Figura 15**.

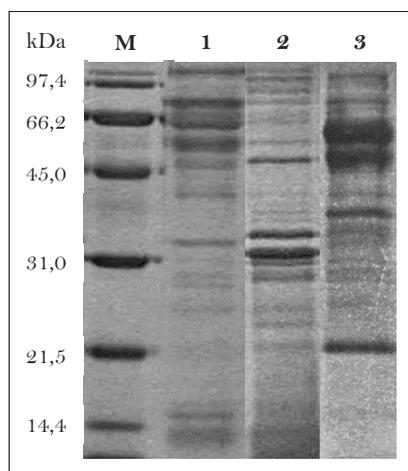


Figura 15. Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas por *T. harzianum* CECT 2413 al medio de cultivo tras 24 h de crecimiento en presencia de paredes celulares de: *R. solani* (1), raíces de tomate (2) y raíces de pepino (3). Los concentrados proteicos se obtuvieron según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. En cada carril se cargaron 15 μ L de sobrenadante de cultivo concentrado (28x, 9x y 14x, respectivamente). M, marcador de peso molecular.

Los resultados obtenidos mostraron que en ningún caso los sobrenadantes proteicos tenían efectos negativos en cuanto al porcentaje de germinación de esporas de las distintas cepas de *Trichoderma* analizadas, sin embargo, sí se vio afectada la elongación de los tubos germinativos en comparación con la condición control (agua), observándose aglomeración de las germínulas así como tubos germinativos más cortos, si bien, no hubo diferencias entre la cepa silvestre y las cepas QID74 Δ 1, QID74 Δ 2, QID74T1 y QID74T2 (comparar los ejemplos mostrados en las **Figuras 16A-C** y **16F**).

(ii) Para evaluar la resistencia frente a compuestos tóxicos secretados por plantas, se analizó el porcentaje de germinación de esporas y el crecimiento de las germínulas de las diferentes cepas en estudio en presencia de exudados de raíces de pepino y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Como se muestra en la **Figura 16D**, en este caso tampoco se observaron diferencias entre la cepa silvestre y las cepas QID74 Δ 1, QID74 Δ 2, QID74T1 y QID74T2. En el caso de los exudados vegetales, las esporas de todas las cepas evaluadas fueron capaces de germinar y elongar el tubo germinativo en la misma medida, si bien se observó que, en general, el efecto tóxico de los exudados vegetales sobre el crecimiento de las germínulas fue menor que el observado en el ensayo anterior de autoprotección. Por otra parte, en presencia de H_2O_2 se encontró que las esporas de ninguna de las cepas evaluadas fueron capaces de germinar (**Figura 16E**).

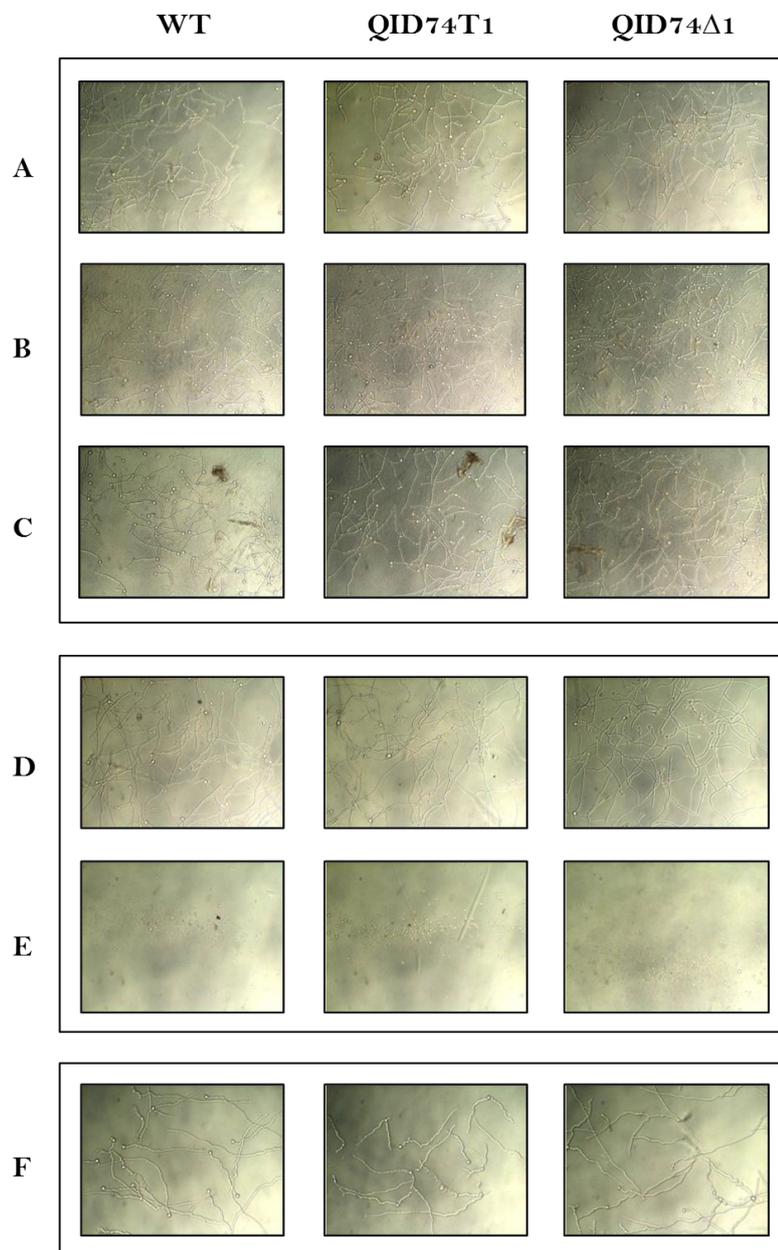


Figura 16. Efecto de distintos compuestos antifúngicos sobre cepas de *T. harzianum*. WT, cepa silvestre CECT 2413; QID74T1, transformante que sobreexpresa *qid74*; QID74Δ1, mutante nulo de *qid74*. A-C: germínulas de *T. harzianum* en presencia de concentrados de proteínas secretadas por *T. harzianum* CECT 2413 (ensayos de autoprotección celular). Los concentrados proteicos se obtuvieron según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos tras 24 h de crecimiento de *T. harzianum* CECT 2413 en presencia de paredes celulares del hongo *R. solani* (A); paredes celulares de raíces de plantas de pepino (B); o paredes celulares de raíces de plantas de tomate (C), como fuentes de carbono. El perfil de proteínas producidas por la cepa *T. harzianum* CECT 2413 en cada condición de cultivo se muestra en la Figura 15. D-E: germínulas de *T. harzianum* en presencia de compuestos tóxicos producidos por plantas. D: exudados de raíces de plantas de pepino (obtenidos según se describe en el apartado 10.2.2 de Materiales y Métodos). E: H₂O₂ 4 mM. F: germínulas de *T. harzianum* con agua ultrapura estéril en sustitución del compuesto antifúngico (controles negativos). Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación según se describe en el apartado 10.2 de Materiales y Métodos. Cada pocillo contenía: 36 μL del agente antifúngico, 4 μL de medio líquido PDB 5x, y 20 μL de una suspensión de 800 esporas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente. Los concentrados proteicos de *T. harzianum* CECT 2413 y los exudados vegetales se utilizaron a una concentración final 5x. Las placas se incubaron a 22°C en oscuridad durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se evaluó el porcentaje de germinación de esporas de las cepas fúngicas evaluadas y la elongación de los tubos germinativos.

(iii) Finalmente, se examinó la resistencia de las cepas en estudio a los fungicidas químicos miconazol y terbinafina. En estos ensayos tampoco se observaron diferencias entre la cepa silvestre y las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2. La concentración mínima inhibitoria (CMI) en todos los casos se mantuvo entre 15 y 25 ppm y todas las cepas toleraron mejor la terbinafina que el miconazol (ejemplo mostrado en la **Figura 17**). A partir de 50 ppm no se observó crecimiento micelial en ninguna de las cepas.

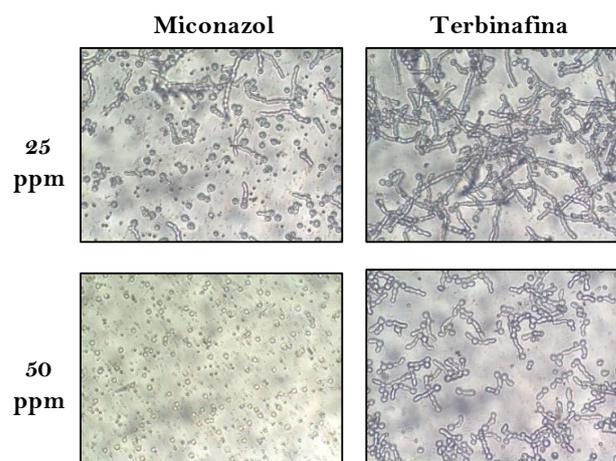


Figura 17. Imágenes representativas del efecto de los fungicidas químicos miconazol y terbinafina sobre cepas de *T. harzianum*. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación según se describe en el apartado 10.2.3 de Materiales y Métodos. Cada pocillo contenía: 50 μ L de la solución antifúngica, 75 μ L de medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v), y 125 μ L de una suspensión con 2×10^5 esporas de la cepa fúngica correspondiente (8×10^5 esporas/mL en cada pocillo). La CMI se determinó después de 72 h de crecimiento a 28°C en oscuridad.

Por tanto, los resultados obtenidos en los distintos ensayos de resistencia llevados a cabo indicaron que la sobreexpresión o la delección del gen *qid74* en *T. harzianum* CECT 2413 no parecía alterar la resistencia del micelio frente a los diferentes compuestos antifúngicos evaluados.

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL GEN *qid74* EN LA INTERACCIÓN *Trichoderma*-PLANTA

3.1. Análisis de expresión del gen *qid74*

Como una primera aproximación para investigar un posible papel de *qid74* en la interacción *Trichoderma*-planta, se analizó su patrón de expresión en distintas

condiciones, *in vivo* e *in vitro*, relacionadas con dicha interacción, mediante *Northern blot*.

En primer lugar, se analizó la expresión de *qid74* en micelio de *T. harzianum* cultivado a distintos tiempos (4 h, 9 h y 24 h) en contacto con raíces de plántulas de pepino (sistema de interacción *Trichoderma*-planta descrito en el apartado 10.5.3.1 de Materiales y Métodos), en comparación con la presencia de una superficie inerte (fibras de nailon en sustitución del sistema radical de las plántulas), así como en medio basal PGM. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de *qid74* era inducida rápidamente (4 h) en presencia de plántulas (**Figura 13A**; PGM+P), mientras que a tiempos cortos había mucho menos expresión en PGM, y apenas se detectaban niveles de ARNm en el micelio en presencia de fibras de nailon (**Figura 13A**; PGM+N). Este resultado indicaba que la expresión de *qid74* durante las primeras horas de interacción *Trichoderma*-planta se debía a un reconocimiento específico (físico y/o químico) de la presencia de la planta por parte del hongo y no a una mera cuestión de contacto físico con una superficie sólida cualquiera (como sería el caso de las fibras de nailon). Como se muestra en la **Figura 13A**, a tiempos más largos (9 h y 24 h) se detectaron altos niveles de ARNm de *qid74* en todas las condiciones ensayadas.

Posteriormente, con el fin de evaluar si la temprana expresión de *qid74* durante la interacción *Trichoderma*-planta estaba relacionada con el reconocimiento por parte del hongo de componentes de la pared celular vegetal, se analizó la expresión de *qid74* en micelio de *T. harzianum* cultivado en medio PGM con paredes celulares de raíces, o con carboximetilcelulosa (CMC) (la celulosa es el componente mayoritario de las paredes celulares vegetales) como fuente de carbono (los cultivos se realizaron según se describe en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos). Como se muestra en la **Figura 13B**, al igual que ocurría en el ensayo de interacción con plántulas *in vivo* (PGM+P), en ambos casos (PGM+PCP y PGM+CMC) se observó una fuerte expresión de *qid74* desde las 4 h de cultivo.

Finalmente, para analizar si el diálogo químico que establecen hongo y planta durante su interacción participaba en la inducción de *qid74*, se cultivó micelio de *T. harzianum* en medio PGM donde previamente se había llevado a cabo un ensayo de interacción *Trichoderma*-planta durante 24 h (el sobrenadante de este ensayo se recogió por filtración y se utilizó como medio de cultivo para estudiar la expresión de *qid74* en un nuevo cultivo de *T. harzianum* solo). Como se muestra en la **Figura 13A**, en este medio (SB_{T-P}) se observó un aumento significativo en el nivel de ARNm de *qid74*

respecto al medio basal PGM, indicando que componentes solubles liberados al medio durante la interacción *Trichoderma*-planta que previamente había tenido lugar, aumentaban el nivel de expresión de *qid74*, si bien este efecto no ocurría hasta las 9 h de cultivo del micelio.

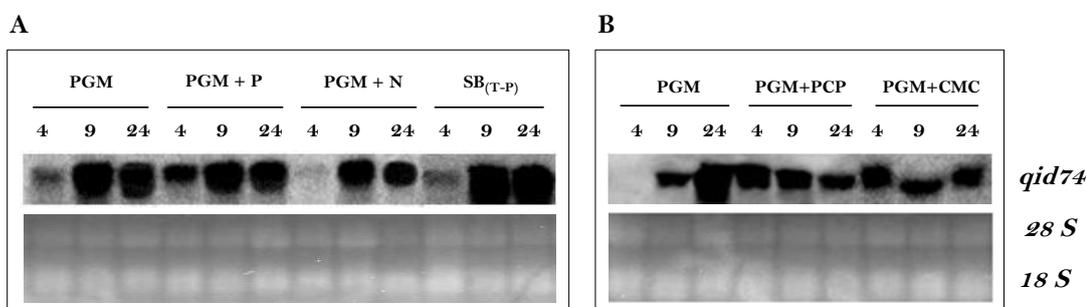


Figura 13. Análisis tipo *Northern* del gen *qid74* de *T. harzianum* CECT 2413. Cada carril contiene 20 µg de ARN total extraído de micelio cultivado, según se describe en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos, durante 4, 9 y 24 h en medio PGM en distintas condiciones relacionadas con la interacción con plantas. A: medio PGM con plántulas de pepino (PGM+P) (sistema de interacción *Trichoderma*-planta descrito en el apartado 10.5.3.1 de Materiales y Métodos); medio PGM en el que se retiraron las plántulas de pepino y se sustituyeron por fibras de nailon (PGM+N) antes de la inoculación del medio con *T. harzianum*; medio PGM en el que se retiraron las plántulas de pepino antes de la inoculación del medio con *T. harzianum* (PGM); medio PGM donde previamente se había llevado a cabo un ensayo de interacción *Trichoderma*-planta según se indica en el texto [SB_(T-P)]. B: medio PGM suplementado con paredes celulares de raíces de plantas de pepino (PGM+PCP) al 1% (p/v); carboximetilcelulosa (PGM+CMC) al 0,5% (p/v); o glucosa al 0,1% (p/v) (PGM). Como sonda se utilizó un fragmento de 0,4 kb de la ORF del gen *qid74*, amplificado con los oligonucleótidos Q74F y Q74R y marcado con digoxigenina. Como control de carga se muestra una tinción del gel de agarosa con BrEt para visualizar el ARNr 28S y 18S.

3.2. Competencia rizosférica

Con el propósito de estudiar si la proteína Qid74 participaba en la competencia rizosférica de *T. harzianum* CECT 2413, se analizó la capacidad de la cepa silvestre y de las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2 para adherirse y colonizar raíces tanto a nivel externo como interno. Con este fin, el crecimiento de las plantas se llevó a cabo utilizando un sistema de cultivo hidropónico (descrito en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos) que resultó idóneo en los estudios de interacción *Trichoderma*-planta, ya que al carecer de sustrato sólido se facilita tanto el manejo del material biológico como la visualización del proceso de colonización.

Para poder realizar el seguimiento *in vivo* del proceso de colonización de las raíces mediante microscopía confocal, en primer lugar se abordó la construcción de cepas de *T. harzianum* marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP).

3.2.1. Obtención de cepas de *T. harzianum* CECT 2413 marcadas con proteína verde fluorescente (GFP)

La construcción de cepas de *T. harzianum* marcadas con GFP se llevó a cabo mediante cotransformación de protoplastos de las cepas silvestre, QID74T2 y QID74Δ2 con los plásmidos pZEGA 1, que porta el gen reportero *gfp*, y pAN7-1, que porta el gen *hph* de resistencia a higromicina como marcador de selección (**Figura 48** de Materiales y Métodos). Como resultado de la transformación se aislaron un total de 32 regenerantes estables por cepa tras sucesivas rondas de crecimiento, alternando medios con y sin selección. Para comprobar la incorporación del gen *gfp* en el genoma de los regenerantes, se realizó un primer escrutinio por PCR utilizando los oligonucleótidos pptUP y psil-Term 1, que amplifican un fragmento de 1 kb del casete de expresión que incluye el extremo 3' del promotor *pki1*, el gen *gfp* y el extremo 5' del terminador *cbh2*. El análisis mediante electroforesis de los productos de PCR confirmó la presencia del gen *gfp* en 19 (59,4%) regenerantes obtenidos a partir de la cepa silvestre y en 26 (81,3%) regenerantes obtenidos a partir de cada una de los transformantes QID74 (datos no mostrados). A continuación, se seleccionaron aquellos transformantes que mostraron un crecimiento normal en medio PDA, y se verificó la integración del gen *gfp* en el genoma mediante análisis tipo *Southern*. Para determinar el número de inserciones ectópicas se digirió ADN genómico con la enzima *XbaI*, cuya diana se encuentra en un solo sitio del vector de expresión pZEGA 1 (fuera del gen *gfp*, **Figura 49**), y se hibridó con una sonda que contenía el gen *gfp*. Como se muestra en la **Figura 18**, en todos los transformantes analizados se confirmó la presencia del gen *gfp* y, si bien cada transformante presentó un distinto patrón de hibridación, en la mayoría de ellos se detectó una banda intensa de aproximadamente 5,2 kb (correspondiente al tamaño del plásmido pZEGA1) que podría corresponder a copias insertadas en tándem. El resto de bandas detectadas mostraron diferentes intensidades y tamaños, y podrían corresponder a inserciones de una sola copia o bien a inserciones truncadas. Se observó que la mayoría de los transformantes presentaban bandas del mismo tamaño, resultado que sugiere sitios preferentes de integración ectópica, fenómeno descrito previamente en *T. harzianum* CECT 2413 por Limón y col. (1999).

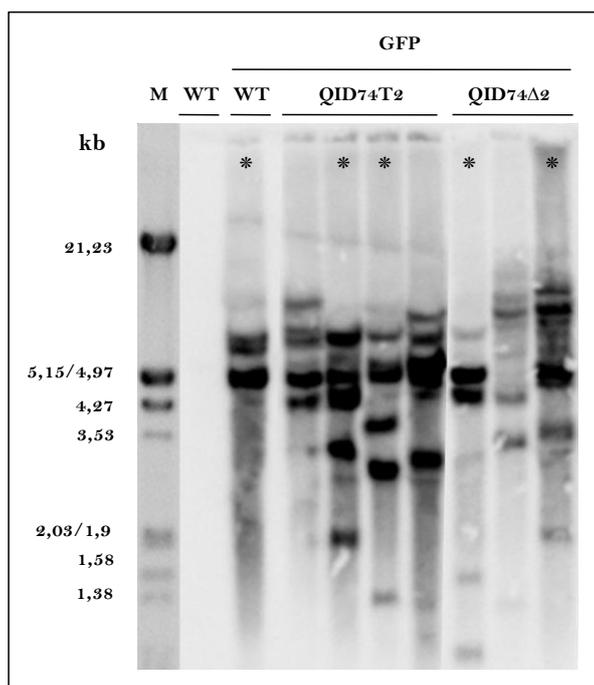


Figura 18. Análisis tipo *Southern* de la cepa silvestre y transformantes de *T. harzianum* CECT 2413. Cada carril contiene 10 µg de ADN genómico digerido con la enzima de restricción *Xba*I, cuyo único corte dentro del vector pZEGA 1 permite estimar el número de inserciones. Como sonda se utilizó un fragmento de 1 kb (que contiene al gen *gfp*), amplificado con los oligonucleótidos pptUP y psil-Term 1, marcado con digoxigenina. M, marcador de peso molecular λ *Eco*RI/*Hind*III. WT, cepa silvestre; QID74T2, cepa que sobreexpresa *qid74*; QID74Δ2, mutante nulo *qid74*. * Transformantes seleccionados para el estudio de colonización de raíces.

La expresión del gen *gfp* en los transformantes seleccionados se confirmó mediante microscopía de fluorescencia. Estos transformantes se denominaron de forma abreviada: GFP/WT, GFP/QID74Ta, GFP/QID74Tb, GFP/QID74Δa y GFP/QID74Δb.

3.2.2. Adherencia y colonización

En primer lugar, se evaluó la capacidad del micelio de la cepa silvestre y de las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2 para adherirse a la superficie de raíces de plántulas de pepino. Como se muestra en la **Figura 19**, a las 24 horas de interacción tanto la cepa silvestre como las demás cepas en estudio se encontraban completamente adheridas a las raíces. Todas las cepas, sin distinción, mostraron un fuerte grado de adherencia que dificultaba la separación del micelio del sistema radical de las plántulas.

El seguimiento del proceso de colonización de las raíces se llevó a cabo mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para ello, según se describe en el apartado 10.5.3.2 de Materiales y Métodos, se cultivaron plántulas de pepino en presencia de germínulas de las cepas de *T. harzianum* marcadas con GFP (GFP/WT, GFP/QID74Ta, GFP/QID74Tb, GFP/QID74Δa y GFP/QID74Δb) y se examinó su capacidad de penetrar en las raíces y colonizarlas a nivel interno.

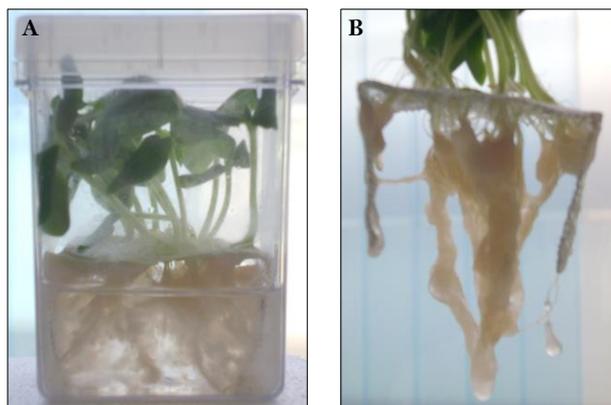


Figura 19. Imágenes representativas de los ensayos de adherencia de cepas de *T. harzianum* a las raíces de plántulas de pepino (sistema de interacción *Trichoderma*-planta descrito en el apartado 10.5.6 de Materiales y Métodos). A: plántulas de pepino cultivadas en medio líquido PGM inoculado con micelio de *T. harzianum*. B: micelio de *T. harzianum* completamente adherido a las raíces tras 24 h de cultivo.

A 10 horas postinoculación (hpi) se observó que las germínulas de todas las cepas en estudio se encontraban profusamente adheridas a la superficie de las raíces. A nivel microscópico, tampoco se detectaron diferencias entre la cepa GFP/WT y las cepas GFP/QID74Ta, GFP/QID74Tb, GFP/QID74Δa y GFP/QID74Δb. A las 24 hpi se observó que las hifas de todas las cepas examinadas se encontraban firmemente ancladas a la superficie de las raíces (ejemplo en la **Figura 20A**), principalmente en la zona apical (ejemplo en la **Figura 20B**) aunque sin colonización interna aparente. A las 48 hpi se comprobó que todas las cepas en estudio habían sido capaces de penetrar la epidermis de las raíces y de colonizar incipientemente los espacios intercelulares del tejido radical. Finalmente, a 120 hpi se observó un crecimiento fúngico extensivo entre las células epidérmicas del tejido radical, tanto en el caso de la cepa GFP/WT como de las cepas GFP/QID74Ta, GFP/QID74Tb, GFP/QID74Δa y GFP/QID74Δb (ejemplo en la **Figura 20C**).

Cabe mencionar que no se observaron cambios en la morfología de las hifas de ninguna de las cepas de *T. harzianum* examinadas durante la interacción con las raíces de plántulas de pepino, tales como estructuras tipo papilas o tipo levaduriforme que Chacón y col. (2007) describieron durante la interacción de *T. harzianum* con raíces de plantas de tomate. Sin embargo, sí se observaron cambios morfológicos en la arquitectura del tejido radical. El efecto de la cepa silvestre y de las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2 sobre el desarrollo del tejido radical se describe detalladamente en el apartado 3.3.

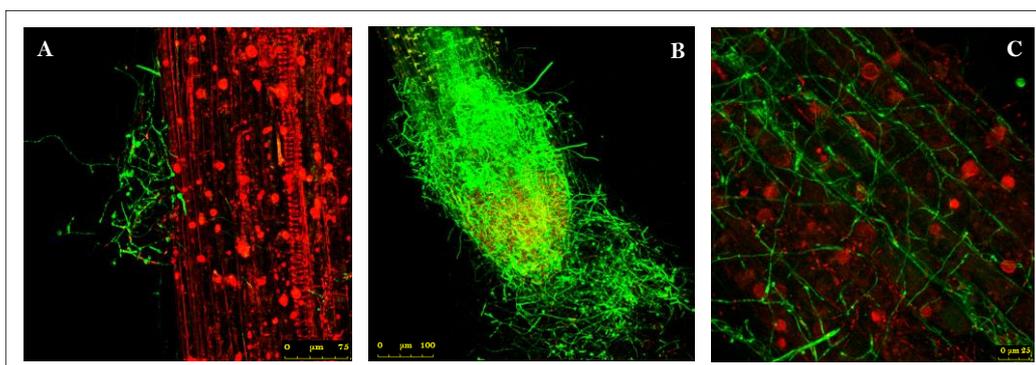


Figura 20. Análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia de la colonización de raíces de plántulas de pepino por cepas de *T. harzianum* marcadas con GFP. Los ensayos de interacción *Trichoderma*-planta se realizaron con plántulas cultivadas en medio líquido PGM inoculado con germínulas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (según se describe en el apartado 10.5.6 de Materiales y Métodos). La fluorescencia verde corresponde a las células fúngicas; la fluorescencia roja corresponde a las células vegetales teñidas con ioduro de propidio. A: hifas de *T. harzianum* ancladas a la superficie de la raíz a 24 hpi. B: crecimiento profuso del micelio de *T. harzianum* alrededor del ápice de la raíz a 24 hpi. C: crecimiento de *T. harzianum* entre las células epidérmicas del tejido radical a 120 hpi.

Finalmente, con objeto de cuantificar el nivel de colonización de las cepas de *T. harzianum* en estudio en el interior de las raíces de las plantas de pepino, se determinó la cantidad de ADN fúngico presente dentro del tejido radical mediante PCR a tiempo real. Para ello, previamente se retiró el micelio adherido a la superficie de las raíces, según se describe en el apartado 10.5.6 de Materiales y Métodos. Como se muestra en la **Figura 21**, hasta 96 hpi los niveles de ADN fúngico detectados fueron mínimos. Sin embargo, a 120 hpi se detectó un incremento significativo en la cantidad de ADN en la mayoría de las cepas analizadas, resultado que confirmaba la presencia de micelio activo capaz de crecer dentro del tejido radical, si bien no se encontró correlación entre los niveles de ADN detectados y la sobreexpresión o delección del gen *qid74*.

En conjunto, los resultados presentados en este apartado confirman que *T. harzianum* CECT 2413 es capaz de adherirse, penetrar y colonizar las raíces de plántulas de tomate, aunque no se encontró ninguna relación entre estas cualidades y la sobreexpresión o delección del gen *qid74*.

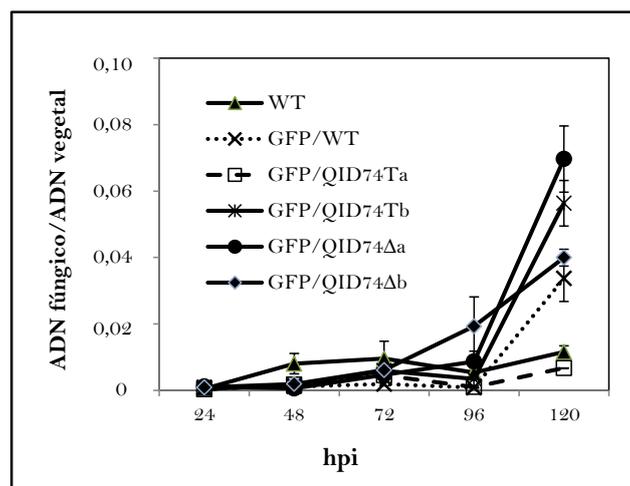


Figura 21. Análisis mediante PCR a tiempo real de la presencia de *T. harzianum* en el interior de raíces de plántulas de pepino. WT, cepa silvestre; GFP/WT, cepa silvestre marcada con GFP; GFP/QID74Ta y GFP/QID74Tb, transformantes que sobreexpresan *qid74* marcados con GFP; GFP/QID74Δa y GFP/QID74Δb, mutantes nulos de *qid74* marcados con GFP. Los ensayos de interacción *Trichoderma*-planta se realizaron con plántulas cultivadas en medio líquido PGM inoculado con germinulas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (según se describe en el apartado 10.5.6 de Materiales y Métodos). Los valores representados corresponden a la cantidad media de ADN de *T. harzianum* detectado en dos muestras (6 plantas/muestra) procedentes de experimentos independientes, utilizando los oligonucleótidos Q2413f y Q2413r. Como gen normalizador se utilizó el gen de la actina de *C. sativus*, amplificado con los oligonucleótidos CS-Factin y CS-Ractin. hpi, horas postinoculación.

3.3. Efecto sobre la germinación de semillas, crecimiento y estatus nutricional de las plantas

3.3.1. Ensayos en fitotrón

En primer lugar, con el propósito de evaluar si la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2 tenían algún efecto sobre la germinación de semillas y el crecimiento vegetal, se sembraron semillas de tomate pildoradas con una suspensión de esporas de la cepa fúngica correspondiente en cajas Magenta® con medio MS semisólido (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). Tras 20 días de incubación de las semillas no se observaron diferencias significativas entre las pildoradas con la cepa silvestre y las semillas no pildoradas (control negativo), tanto a nivel de la tasa de germinación, como a nivel de longitud de la parte aérea de las plántulas (datos no mostrados). Tampoco se observaron diferencias significativas entre las semillas pildoradas con la cepa silvestre y las pildoradas con las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2. Estos resultados indican que, en las condiciones ensayadas, *T. harzianum* CECT 2413 no

parece tener efecto sobre la capacidad de germinación de las semillas de tomate ni sobre el crecimiento de las plántulas, y que la sobreexpresión o la delección del gen *qid74* en esta cepa no altera estos parámetros.

Por otro lado, también se examinó si la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2 tenían efecto sobre el desarrollo de las raíces. Para ello, se llevaron a cabo ensayos en medio semisólido MS y se evaluó el desarrollo de las raíces en plántulas de tomate (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). A 7 días postinoculación (dpi) se observó que tanto las raíces primarias como las secundarias de las plántulas tratadas con la cepa silvestre eran significativamente más cortas que las raíces de las plántulas que no habían sido tratadas. La longitud de las raíces principales se redujo en un 43% y la de las secundarias en un 28% respecto al control negativo (plántulas sin tratar). El número de raíces secundarias no se vio afectado (datos no mostrados). Como se muestra en la **Figura 22**, al comparar el efecto de la cepa silvestre con el de las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2 no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la longitud de las raíces principales, pero sí en la longitud y cantidad de raíces secundarias. Las plántulas tratadas con las cepas que sobreexpresan *qid74* exhibieron raíces secundarias más largas que las plántulas tratadas con la cepa silvestre (entre 30% y 42% de incremento), aunque estas fueron menos abundantes (entre 33% y 44% de reducción). Por el contrario, las plántulas tratadas con los mutantes nulos de *qid74* exhibieron raíces secundarias significativamente más cortas que las plántulas tratadas con la cepa silvestre (entre 27% y 35% de reducción).

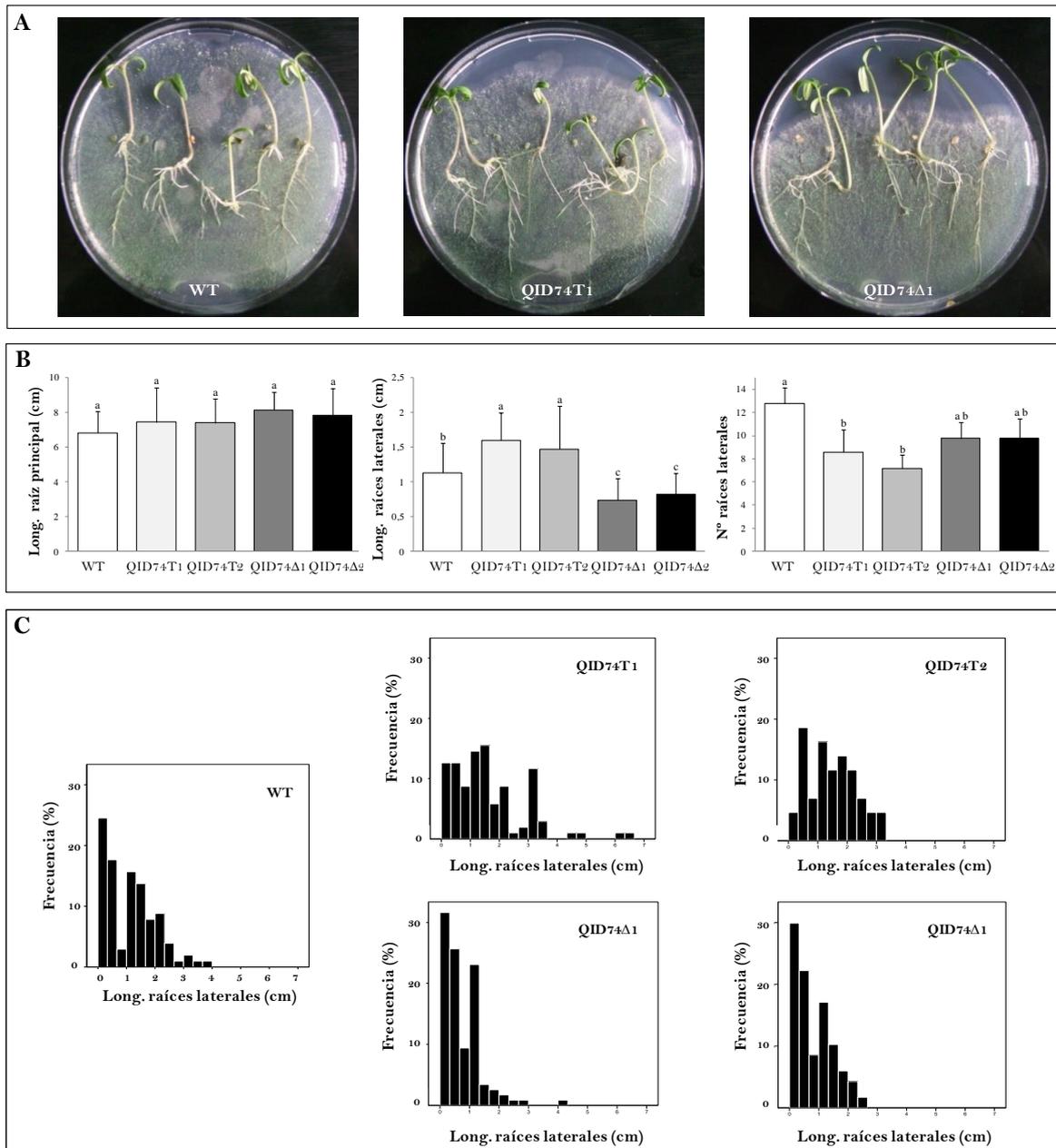


Figura 22. Efecto de *T. harzianum* en la arquitectura de las raíces de plántulas de tomate. WT, cepa silvestre; QID74T1 y QID74T2, transformantes que sobreexpresan *qid74*; QID74Δ1 y QID74Δ2, mutantes nulos de *qid74*. A: plántulas de tomate cultivadas en medio MS semisólido inoculado con esporas de *T. harzianum* de la cepa correspondiente (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). B: representación gráfica de la longitud media de las raíces principales, la longitud media de las raíces laterales, y el número de raíces laterales por plántula. C: distribución de la longitud de las raíces laterales. Los valores que difieren significativamente están representados por letras diferentes (Test de Duncan; $P=0,05$).

Con objeto de confirmar el efecto de las cepas de *T. harzianum* en estudio sobre la arquitectura de las raíces, se analizaron raíces de plántulas de pepino tratadas con germínulas de la cepa fúngica correspondiente en cajas Phytatray™ con medio líquido PGM (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). A 7 dpi no se observaron diferencias significativas entre el efecto de la cepa silvestre y el control negativo (agua) en cuanto a la longitud de la raíz principal de las plántulas, así como tampoco se observaron diferencias significativas entre la longitud de las raíces principales tratadas con la cepa silvestre y con las cepas QID74Δ1, QID74Δ2, QID74T1 y QID74T2. Sin embargo, sí se observó que había cambios notables en la estructura de las raíces secundarias. Las plántulas tratadas con la cepa silvestre exhibieron raíces secundarias con pelos radicales más largos y más abundantes que las plántulas sin tratar (control negativo con agua). Además, las raíces secundarias de las plántulas colonizadas por las cepas que sobreexpresaban *qid74* exhibían mayor densidad de pelos radicales que las plántulas tratadas con la cepa silvestre (**Figura 23A y 23B**). El efecto de los mutantes nulos de *qid74* sobre las raíces secundarias fue similar al del control negativo (agua) (**Figura 23C**). Por otro lado, se observó que las hifas, tanto de la cepa silvestre como de las cepas transformantes y disruptantes eran capaces de enroscarse alrededor de los pelos radicales (**Figura 23D**), fenómeno también observado durante la interacción de *T. asperelloides* con raíces de plántulas de pepino (Yedidia y col., 2000).

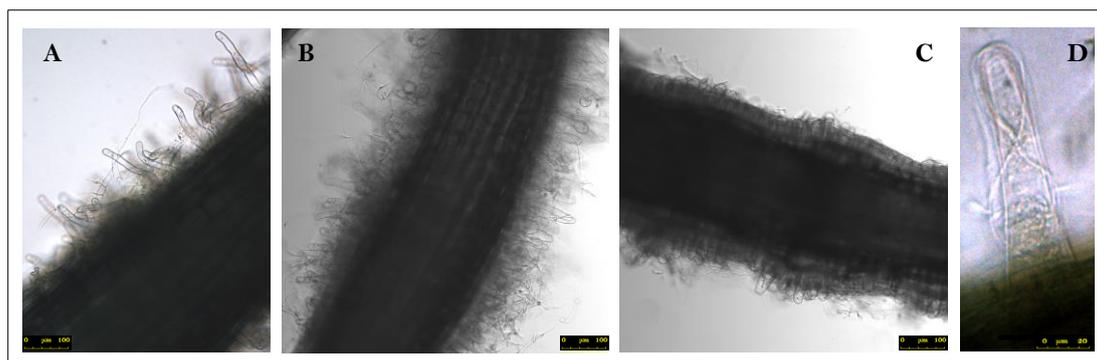


Figura 23. Análisis microscópico del efecto de cepas de *T. harzianum* en el desarrollo del sistema radical de plántulas de pepino. Los ensayos de interacción *Trichoderma*-planta se realizaron con plántulas cultivadas en medio líquido PGM inoculado con germínulas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). A: raíz secundaria colonizada por la cepa silvestre CECT 2413. B: raíz secundaria colonizada por la cepa que sobreexpresa *qid74* (QID74T1). C: raíz secundaria colonizada por el mutante nulo de *qid74* (QID74Δ1). D: detalle de una hifa enroscada alrededor de un pelo radical.

3.3.2. Ensayos en invernadero

Teniendo en cuenta que la elongación de raíces secundarias y la formación de pelos radicales podía verse reflejado en una mayor captación de nutrientes como consecuencia del incremento de la superficie radical, se llevaron a cabo ensayos de interacción *Trichoderma*-planta con plantas de pepino y de tomate en invernadero y se evaluó el contenido elemental en la parte aérea de las plantas. Para ello, semillas de tomate y pepino pildoradas con una suspensión de esporas de la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 o de las cepas que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) se sembraron en turba estéril (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). El riego se efectuó con solución nutritiva de Hoagland para garantizar una suficiente disponibilidad de minerales. Al igual que ocurrió en los ensayos anteriores en fitotrón, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la tasa de germinación de semillas. Tampoco se observó un aumento en el nivel de NPK (medido como % p/p) en las plantas de tomate tratadas con las cepas QID74T1 o QID74T2 respecto al tratamiento con la cepa silvestre. Sin embargo, al evaluar el contenido total de NPK (mg/planta) en las plantas de tomate tratadas con las cepas QID74T1 o QID74T2, sí se encontró un aumento significativo respecto al tratamiento con la cepa silvestre. Además, estas plantas también presentaron incrementos significativos en el contenido total de C, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Li, Mn, Na y Zn (**Tabla 2**).

En el caso de las plantas de pepino, no se observaron cambios significativos en el nivel de NPK (% p/p) en las plantas tratadas con las cepas QID74T1 o QID74T2 respecto al tratamiento con la cepa silvestre, ni tampoco en el contenido total (mg/planta) de N y P, pero sí se incrementó significativamente el de K (**Tabla 2**). En cuanto a los demás nutrientes evaluados, se encontró que el contenido total de C, Li y Mn también se incrementó significativamente en la parte aérea de las plantas de pepino tratadas con las cepas QID74T1 o QID74T2, y que el contenido total de B, Cu, Fe y Zn aumentó significativamente al tratar las plantas con la cepa QID74T2.

Por último, teniendo en cuenta que el incremento en el contenido total de nutrientes observado en las plantas tratadas con las cepas que sobreexpresan *qid74* parecía correlacionarse con una mayor biomasa de la parte aérea de las mismas, se cuantificó su longitud y peso seco. Como se muestra en la **Figura 24**, tanto en pepino como en tomate se observó un incremento significativo en el peso seco de las plantas tratadas con las cepas QID74T1 y QID74T2 respecto al de las plantas tratadas con la cepa silvestre (22% y 18% de incremento, respectivamente, en el caso de las plantas de

pepino; 27% y 39% de incremento, respectivamente, en el caso de las plantas de tomate). Además, la longitud de la parte aérea de las plantas de pepino tratadas con las cepas QID74T1 y QID74T2 también fue significativamente mayor que la de las plantas tratadas con la cepa silvestre (14% y 9% de incremento, respectivamente). Por el contrario, en el caso de las plantas de tomate no se encontraron diferencias significativas a este respecto, resultado que ya se había observado en los ensayos en fitotrón.

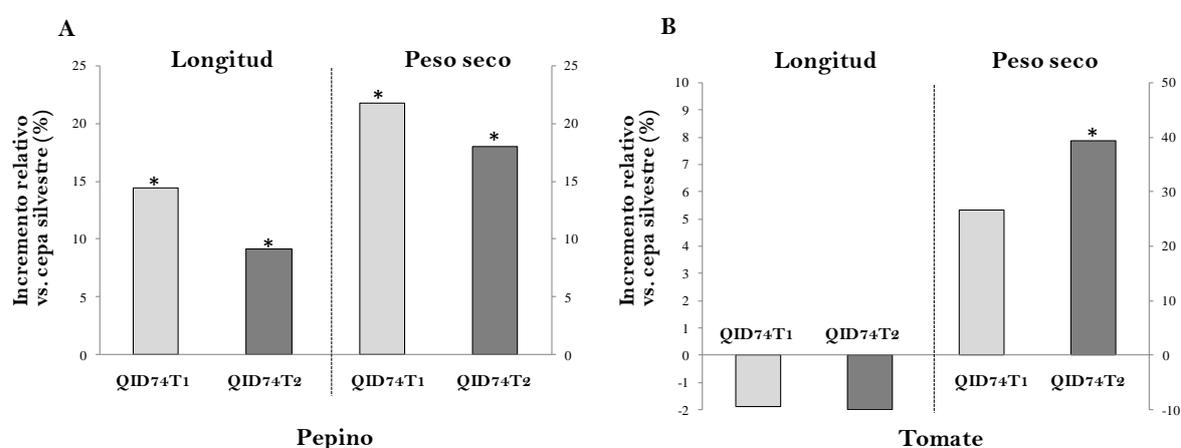


Figura 24. Efecto de cepas de *T. harzianum* en la longitud y el peso seco de la parte aérea de plantas de pepino (A) y tomate (B), a 28 dpi. WT, cepa silvestre; QID74T1 y QID74T2, transformantes que sobreexpresan *qid74*. Los ensayos de interacción *Trichoderma*-planta se realizaron en invernadero utilizando semillas de pepino y de tomate pildoradas con esporas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). * Valores significativamente diferentes en comparación con la cepa silvestre (Test de Duncan; $P=0,05$).

Tabla 2. Contenido elemental en la parte aérea de plantas de pepino y tomate tratadas con distintas cepas de *T. harzianum*. Las semillas se pildoraron con la cepa silvestre (WT) o las cepas que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) y se cultivaron en turba con solución nutritiva Hoagland, bajo condiciones controladas de crecimiento en invernadero. La cuantificación de nutrientes se llevó a cabo a 28 dpi, según se describe en el apartado 10.5.5 de Materiales y Métodos.

Planta y tratamiento	C [†] (mg)	Ca (mg)	K (mg)	Mg (mg)	N (mg)	P (mg)	B (μg)	Cu (μg)	Fe (μg)	Li (μg)	Mn (μg)	Na (μg)	Zn (μg)
Pepino													
WT ^a	312	11	44,5	4,8	38,2	8,1	23,7	5,7	70,3	7	77,8	643,2	47,5
QID74T1 ^a	382,8	11,8	50,7	5,3	38,9	8,5	26,4	6,8	77,8	12	93,3	773,5	48
Incremento ^b (%)	22,7*	7,6	14*	9,7	1,8	4,7	11,7	19,1	10,7	71,4*	19,9*	20,3	1,2
QID74T2 ^a	375,7	11,6	51,7	5,1	38,2	8,7	30,4	9,9	82,4	12,1	92,1	724,6	53,1
Incremento ^b (%)	20,4*	5,8	16,2*	5,9	0,1	7,9	28,3*	74,1*	17,2*	72*	18,3*	12,7	11,9*
Tomate													
WT ^a	103,8	4,3	21,8	1,3	19,6	2,8	8,2	2,9	31,9	1,8	33,5	282,2	18,7
QID74T1 ^a	135,2	5,4	25,5	1,7	23,7	3,6	10,7	3,6	42,7	2,3	40,7	364,6	22,6
Incremento ^b (%)	30,2*	24,9*	17*	35,9*	20,9*	29,2*	30,5*	21,4*	34,1*	29,3*	21,7*	29,2*	20,6*
QID74T2 ^a	162,8	6,3	28,1	2	29,1	4	11	4,2	46,6	2,5	45,9	421,2	28,1
Incremento ^b (%)	56,8*	44,3*	28,8*	52,4*	48,6*	42*	34,6*	42,4*	46,2*	39,2*	37,3*	49,2*	50*

^a Media del contenido elemental absoluto por planta (parte aérea).

^b Incremento respecto a la cepa WT (en %).

[†] C se refiere al contenido de carbono orgánico e inorgánico.

* Valores significativamente mayores que la cepa WT (Test de Duncan; $P=0,05$).

DISCUSIÓN

El gen *qid74* fue descrito por Rosado y col. (2007) como protector contra la acción de enzimas líticas y factor de adherencia a superficies hidrofóbicas. Estas características, unidas al hecho de que se exprese bajo condiciones de micoparasitismo simulado y la presencia de motivos MYREs (*Mycoparasitism responsive elements*) en su promotor, comunes en genes con un papel directo en procesos de micoparasitismo (Cortés y col., 1998), llevó a sugerir para este gen un rol en la interacción *Trichoderma*-hongo fitopatógeno. La proteína Qid74 permitiría a *T. harzianum* no solo fijarse a la superficie celular de su presa, sino además, protegerse frente a los compuestos tóxicos producidos por esta. De acuerdo con esta idea, el análisis transcriptómico de la cepa *T. harzianum* ALL42 llevado a cabo recientemente reveló que el transcrito del gen *qid74* fue el más abundante tras el cultivo del hongo en presencia de paredes celulares de *Fusarium solani* y que, efectivamente, su nivel de expresión aumentó considerablemente tras el contacto con el micelio de este fitopatógeno (Steindorff y col., 2012; Vieira y col., 2013). El análisis de la respuesta transcriptómica de la cepa *T. harzianum* CECT 2413 llevado a cabo en el presente trabajo (Capítulo I), reveló que la transcripción del gen *qid74* también se induce durante la interacción *Trichoderma*-planta (Samolski y col., 2009), siendo su nivel de expresión en presencia de raíces tres veces mayor que en cultivos con quitina. A partir de este resultado nos planteamos que Qid74 también podría cumplir un papel específico durante el establecimiento de la asociación simbiótica con plantas.

En hongos filamentosos, la adherencia a superficies hidrofóbicas está mediada por hidrofobinas. Estas son un tipo de proteínas de pequeño tamaño que se sitúan en la superficie externa de las paredes celulares fúngicas y que participan en diversos procesos fundamentales para el crecimiento y desarrollo como la formación de estructuras aéreas hidrofóbicas (micelio y cuerpos fructíferos) y la protección celular (Wösten, 2001). Las hidrofobinas también participan en interacciones hongo-planta, tanto en procesos patogénicos como en el establecimiento de asociaciones simbióticas (Whiteford y Spanu, 2002). En este contexto, el hecho de que Qid74 contenga, en la mayoría de las repeticiones localizadas en su secuencia, los ocho residuos de cisteína típicamente encontrados en hidrofobinas, podría explicar, *a priori*, el rol de esta proteína en la adherencia a superficies hidrofóbicas y en la protección celular. No obstante, Qid74 no es una hidrofobina, ya que tiene un alto peso molecular, su patrón repetitivo de cisteínas no se ajusta al de este tipo de proteínas (Linder y col., 2005), y

su perfil hidropático no solo no corresponde a ninguna de las clases de hidrofobinas conocidas (Seidl-Seiboth y col., 2011), sino que presenta en su secuencia residuos predominantemente polares (hidrofilicos) [EMBL: CAA64974]. En efecto, en los ensayos de hidrofobicidad llevados a cabo con la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y con los transformantes y disruptantes del gen *qid74* no se encontraron evidencias para afirmar que la proteína Qid74 pueda estar relacionada con la capacidad de las hifas de escapar de un ambiente hidrofílico a uno hidrofóbico ni con la hidrofobicidad superficial del micelio.

Rosado y col. (2007) observaron que Qid74 no participa en la protección del micelio de *T. harzianum* frente a inhibidores de la síntesis de pared celular, como el Rojo Congo o Blanco de Calcoflúor, ni frente a desestabilizadores de las membranas como el SDS, así como tampoco frente a sus propios metabolitos, sin embargo, encontraron que Qid74 sí brinda protección frente a la acción de cócteles enzimáticos comerciales. Por otro lado, nuestros resultados indicaron que Qid74 no brinda protección frente a compuestos tóxicos secretados por las plantas, tampoco frente a la acción de fungicidas químicos que actúan a nivel de membrana, ni frente a sus propias enzimas líticas. No obstante, considerando que el cóctel lítico comercial (Novozym 234) usado en los ensayos de Rosado y col. (2007) está compuesto por glucanasas de *T. harzianum*, sus resultados sí pueden indicar que Qid74 desempeñaría un papel fundamental en la autoprotección celular.

El primer paso para abordar el estudio funcional del gen *qid74* durante el establecimiento de la asociación simbiótica de *T. harzianum* CECT 2413 con las plantas fue analizar su patrón de expresión en diversas condiciones relacionadas con esta interacción. Teniendo en cuenta la implicación de *qid74* en la adherencia del micelio del hongo a superficies hidrofóbicas, cabía pensar que su expresión aumentada en presencia de raíces podía estar promovida por el contacto físico del micelio con la superficie del tejido radical. De hecho, se encontró una fuerte expresión del gen *qid74* desde las primeras horas de cultivo de *T. harzianum* en contacto con raíces, que no se observaba en contacto con fibras de nailon, lo que era indicativo de la existencia de un reconocimiento específico de la planta por parte del hongo. Además, se encontró que esta rápida expresión de *qid74* también tenía lugar tanto en presencia de paredes celulares vegetales como de carboximetilcelulosa, resultado que guarda relación con los de Carapito y col. (2008), quienes observaron que la expresión del ortólogo de *qid74* en *Fusarium graminearum* FG03969 se inducía en presencia de paredes celulares

de lúpulo. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la expresión de *qid74* durante etapas tempranas de la interacción *Trichoderma*-planta implica un reconocimiento específico de los componentes de la pared celular vegetal por parte del hongo. Asimismo, la expresión aumentada del gen *qid74* en presencia del sobrenadante de cultivo resultante de la interacción *Trichoderma*-planta respecto al medio basal apuntó hacia un reconocimiento de los compuestos liberados durante el diálogo molecular establecido entre el hongo y la planta. Entre estos compuestos pueden encontrarse, además de productos de degradación de la pared celular vegetal por acción del hongo, compuestos secretados por el hongo en contacto con las raíces o compuestos exudados por las raíces en contacto con el hongo. Considerando que los compuestos secretados tanto por el hongo como por las plantas pueden tener un efecto antifúngico, la expresión del gen *qid74* en presencia de dichos compuestos podría guardar relación con su participación en la protección de las células fúngicas. Por otro lado, el hecho de haber detectado la expresión de *qid74* en medio mínimo a partir de las 9 h de cultivo sugiere que su expresión, más que estar sujeta a desrepresión catabólica, estaría respondiendo a un estrés nutricional. Esto está de acuerdo con las observaciones de Rosado y col. (2007), quienes basándose en la ausencia de secuencias relacionadas con la regulación por carbono en el promotor del gen *qid74*, atribuyeron su expresión en ausencia de glucosa a un estrés nutricional más que a una desrepresión por ausencia de carbono.

De manera análoga al rol propuesto en el proceso micoparasítico, se contempló la posibilidad de que la proteína Qid74 pudiera mediar la adherencia del micelio de *T. harzianum* a la superficie de las raíces y/o facilitar la colonización de las mismas brindándole protección a las hifas frente a los compuestos de defensa producidos por la planta. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que la expresión del gen *qid74* no le confiere al hongo ninguna ventaja para colonizar las raíces a nivel externo ni interno, lo que sugiere que Qid74 o no está implicada en la competencia rizosférica del micelio de *T. harzianum* CECT 2413 o no resulta esencial para tal fin.

Si bien *qid74* no parece tener efecto en la competencia rizosférica de *T. harzianum*, su inducción específica como consecuencia del reconocimiento de los componentes de las raíces nos llevó a pensar que la proteína Qid74 podría participar en la interacción *Trichoderma*-planta, ejerciendo algún efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. En efecto, al evaluar el impacto de la cepa silvestre y de las cepas transformantes y disruptantes del gen *qid74* sobre las raíces vegetales se

observaron cambios en la arquitectura del sistema radical, específicamente a nivel de raíces secundarias. Por un lado, el tratamiento de las raíces de plántulas de pepino con la cepa silvestre y con los transformantes que sobreexpresan el gen *qid74* promovió la formación de abundantes pelos en las raíces secundarias, siendo el efecto de los transformantes más acusado; mientras que tanto las raíces tratadas con los mutantes nulos, como aquellas que no fueron tratadas con el hongo, mostraron menor densidad y elongación de pelos radicales. Dado que la mayor formación de pelos radicales no suponía una mayor tasa de colonización, se infiere que los pelos radicales no son esenciales para el proceso de colonización de las raíces por parte de *T. harzianum*, a diferencia de lo observado en rizobacterias (Gage, 2004; Prieto y col., 2011). Por otro lado, se encontró que los transformantes que sobreexpresan *qid74* estimularon la elongación de las raíces secundarias en plántulas de tomate pero, a su vez, inhibieron su aparición, lo que podría entenderse como un mecanismo de compensación en el que las plantas que desarrollan raíces secundarias más largas, no requerirían que estas sean más numerosas para una óptima adquisición de nutrientes.

Según se mencionó en la Introducción General de esta Memoria, se ha planteado que uno de los mecanismos que emplea *Trichoderma* spp. para promover el crecimiento vegetal radica en la secreción de factores de crecimiento y/o en la regulación de la síntesis de estos compuestos en la planta. Tal y como plantea el modelo de señalización propuesto por Glick y col. (2007), que explica el efecto de las bacterias promotoras de crecimiento sobre los cultivos, la promoción del crecimiento vegetal por parte de *Trichoderma* spp. también parece relacionarse con el balance de la concentración de auxina/etileno en la rizosfera. Se ha visto que algunas especies de *Trichoderma* son capaces de reducir el efecto inhibitorio del etileno sobre el crecimiento de las raíces mediante la degradación de su precursor –ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)– por la acción de la enzima ACC desaminasa (Viterbo y col., 2010). Además, se ha demostrado que ciertas especies de *Trichoderma* son capaces de producir auxinas y que la regulación de los niveles de auxina, ya sea de origen fúngico o vegetal, derivan en un típico efecto tipo auxina reflejado en un mayor desarrollo del sistema radical y, consecuentemente, en un mayor crecimiento de la planta (Gravel y col., 2007; Contreras-Cornejo y col., 2009). Más aún, el efecto de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento vegetal se ha asociado con cambios en el balance de los niveles hormonales en las plantas, más que con la modificación del nivel de alguna hormona en particular, habiéndose observado que el incremento del ratio auxina/citoquinina tiene un efecto

positivo sobre el crecimiento vegetal (Sofó y col., 2012). La modificación de las raíces secundarias observada en nuestro estudio podría deberse a alteraciones en el balance hormonal, ya sea porque la expresión del gen *qid74* esté conduciendo a una mayor o menor secreción de factores de crecimiento vegetal, o bien porque esté regulando en la planta la expresión de genes implicados en la señalización hormonal. Considerando que el efecto hormonal sobre el sistema radical depende de su justa concentración (Contreras-Cornejo y col., 2009; Ivanchenko y col., 2008), Qid74 podría ser responsable del afinamiento de la concentración hormonal en la planta a un nivel adecuado para promover la elongación de raíces secundarias y la proliferación de pelos radicales sin inhibir el desarrollo de la raíz principal, como parece ocurrir en el caso de la asociación simbiótica *Azospirillum*-planta (Ribaudó y col., 2006).

Teniendo en cuenta que el carácter rico en cisteína de la proteína Qid74 permite asociarla con una extensiva capacidad de unión a metales (Rosado y col., 2007), también es posible que Qid74 sea capaz de actuar como un agente quelante, secuestrando metales presentes en la rizosfera. Se sabe que la arquitectura del sistema radical está controlado por la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera (López-Bucio y col., 2003). De este modo, la concentración de nutrientes disponibles en el medio de cultivo podría haberse visto alterada como consecuencia del tratamiento con las cepas transformantes del gen *qid74*, afectando así la arquitectura de las raíces. De hecho, se ha demostrado que la deficiencia de hierro en el medio de cultivo induce la formación de pelos radicales en plantas de pepino (Santi y Schmidt, 2008).

Los pelos radicales representan puntos principales de contacto entre las plantas y el suelo, llegando a constituir hasta un 70% de la superficie total de las raíces (Richardson y col., 2009). En este sentido, considerando que la elongación de las raíces secundarias y de los pelos radicales promovida por Qid74 estaría incrementando la superficie radical total, cabría esperar que su efecto se viese reflejado en una mayor captación de nutrientes y, consecuentemente, en un mayor crecimiento vegetal. Mediante ensayos de invernadero realizados con plantas de pepino y de tomate se pudo comprobar que, si bien en ningún caso las plantas tratadas con dichos transformantes mostraron un mayor nivel de NPK en la parte aérea con respecto al tratamiento con la cepa silvestre, tanto las plantas de pepino como las de tomate tratadas con los transformantes mostraron un mayor contenido total de micro y macronutrientes en la parte aérea, así como una mayor biomasa y, en el caso de las plantas de pepino, también una mayor longitud. Se sabe que el tratamiento con algunas especies de *Trichoderma*

puede promover el incremento en el contenido de nitrógeno en las plantas y que este incremento se debe al uso eficiente de este mineral, lo que genera mayores rendimientos en los cultivos (Shoresh y col., 2010). En este sentido, el hecho de que las plantas tratadas con los transformantes de sobreexpresión hayan mostrado un mayor contenido total de nutrientes (mg/planta) y una mayor biomasa, pero no una mayor acumulación (% p/p), es indicativo de que la planta ha efectuado un uso eficiente de los mismos. De este modo, los nutrientes absorbidos a través de las raíces secundarias y pelos radicales habrían sido transportados hasta la parte aérea de las plantas y utilizados para la formación de biomasa. Esta habilidad, beneficiosa para las plantas, resultaría especialmente útil para el cultivo de plantas en suelos marginales, en los que los recursos son limitados.

La mayor captación de nutrientes en plantas como consecuencia del tratamiento con *Trichoderma* spp. ya había sido descrita previamente; sin embargo, no se había establecido el mecanismo responsable de este fenómeno que, además, no siempre dio lugar a una promoción del crecimiento (Yedidia y col., 2001; Azarmi y col., 2011). Teniendo en cuenta que nuestros ensayos se llevaron a cabo minimizando la influencia de otros microorganismos y asegurando la disponibilidad de nutrientes (mediante el uso de turba estéril regada con soluciones que garantizan cantidades suficientes de macro y micronutrientes), el efecto biofertilizador observado en este estudio se puede atribuir a la mayor captación de nutrientes como consecuencia de una mayor superficie del sistema radical, más que a la solubilización de nutrientes por parte del hongo (Samolski y col., 2012). En todo caso, esta Tesis Doctoral ha pretendido iniciar un camino en una dirección en la que se precisan estudios adicionales, tanto a nivel de la planta como del hongo, con el fin de elucidar los mecanismos que subyacen tras la promoción del crecimiento de las plantas por parte de *Trichoderma* spp.

Capítulo III: Caracterización funcional del gen *asp1*
de *T. harzianum* CECT 2413.

INTRODUCCIÓN

Las peptidasas o péptido-hidrolasas (también llamadas proteasas o proteinasas) son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico. Este tipo de enzimas se caracteriza por tener una distribución ubicua entre las distintas formas de vida, así como por su variabilidad en la localización celular y la diversidad de procesos fisiológicos y metabólicos en los que intervienen (Rawlings y col., 2004). Al tratarse de un grupo tan amplio y diverso su terminología es complicada. En los últimos años, la facilidad para conocer la secuencia de aminoácidos de las proteínas, deducida a partir de las secuencias de ADN, ha proporcionado una nueva dimensión al estudio de las peptidasas, permitiendo un mejor entendimiento de la organización de los diferentes dominios de estas enzimas, así como de su función y evolución. Esta información ha dado lugar a una sofisticada clasificación que integra varios criterios: la relación filogenética reflejada en su estructura, el mecanismo catalítico, la reacción que catalizan y la sensibilidad que presentan frente a inhibidores específicos (Rawlings y col., 2012). La clasificación actual incluye las categorías de clan, familia y subfamilia, siendo aspartil- serín- metalo- y cisteín-peptidasas los principales tipos catalíticos (<http://merops.sanger.ac.uk>).

Como se comentó en la Introducción General de esta Memoria, la secreción de enzimas hidrolíticas forma parte fundamental del proceso micoparasítico llevado a cabo por las especies del género *Trichoderma* que son capaces de actuar como eficientes ACBs frente a hongos patógenos de plantas (Viterbo y col., 2002b). Desde hace décadas se sabe que las especies de *Trichoderma* producen proteasas extracelulares con potencial implicación en la actividad antagonista (Elad y col., 1982, Rodríguez-Kábana y col., 1978), sin embargo, tradicionalmente se ha prestado mayor atención a otros sistemas enzimáticos (p. ej. quitinasas y glucanasas) por su evidente asociación con la degradación de los principales carbohidratos que componen la pared celular de los hongos parasitados. Afortunadamente, en los últimos años numerosos estudios han tenido como principal objetivo explorar el sistema proteolítico secretado por diferentes especies de *Trichoderma* y su contribución al biocontrol (revisado por Kredics y col., 2009). Algunas de estas proteasas han sido purificadas a homogeneidad y algunos genes han sido clonados y caracterizados. Una de las proteasas más estudiadas ha sido PRB1, una serín-peptidasa tipo subtilisina, cuyo gen se ha clonado a partir de *T. atroviride* IMI 206040 (anteriormente clasificada como *T. harzianum* IMI 206040; Geremia y col., 1993), *T. virens* Gv29.8 (Pozo y col., 2004), *T. hamatum* LU593

(Steyaert y col., 2004) y *T. harzianum* CECT 2413 (Suárez y col., 2007). La sobreexpresión de *prb1*, en *T. atroviride*, y la de su homólogo, *tvsp1*, en *T. virens*, mejoró de manera significativa la capacidad de estas especies para proteger plántulas de algodón frente al hongo patógeno *R. solani*, (Flores y col., 1997; Pozo y col., 2004). Además, también se demostró que la sobreexpresión de *prb1* mejoraba la protección de plantas de tomate frente al nematodo *Meloidogyne javanica* (Sharon y col., 2001).

Las proteasas producidas por *Trichoderma* spp. durante su actividad de biocontrol estarían participando en la degradación de proteínas estructurales de la pared celular y membrana plasmática fúngica (o de la cutícula en el caso de los nematodos), con el fin de favorecer la penetración y colonización del hospedador, a la vez que le proporcionarían nutrientes en forma de aminoácidos (Kredics y col., 2009). También se ha propuesto que podrían estar implicadas en la liberación o activación de otras enzimas o toxinas que las especies de *Trichoderma* producen durante su actividad antagonista; o alternativamente, en la inactivación de factores de virulencia de origen proteico producidos por los organismos fitopatógenos para suprimir la respuesta inmune de la planta hospedadora durante el curso de la infección del tejido vegetal (Elad y Kapat, 1999; Viterbo y col., 2004).

Concretamente, en la cepa *T. harzianum* CECT 2413 (objeto de estudio en esta Tesis doctoral), se ha purificado a homogeneidad una serín-peptidasa extracelular tipo tripsina, denominada PRA1, cuya expresión aumenta en presencia de paredes celulares fúngicas o de quitina, presentando también actividad nematocida (Suárez y col., 2004). En esta misma cepa se clonó y caracterizó el gen de una aspartil-peptidasa, *papA* (Delgado-Jarana y col., 2002), cuyo homólogo en *T. asperelloides* T-203 (anteriormente clasificada como *T. asperellum* T-203) se induce durante la interacción micoparásita con *R. solani* y durante la interacción simbiótica con raíces de plantas de pepino (Viterbo y col., 2004). Adicionalmente, en un análisis del proteoma de *T. harzianum* CECT 2413 inducido en presencia de paredes celulares de distintos hongos, se aisló una segunda aspartil-peptidasa extracelular, denominada ASP1 (anteriormente P6281; Suárez y col., 2005). Interesantemente, en un estudio proteómico posterior llevado a cabo en otra cepa de *T. harzianum*, cultivada en presencia de micelio de *R. solani*, se llegó a la identificación de dos proteasas con expresión diferencial, y una de ellas resultó ser ASP1 (Tseng y col., 2008). Asimismo, otro estudio proteómico en *T. atroviride* permitió identificar tres proteasas inducidas en presencia de paredes celulares de *R. solani*: la proteína ortóloga de PRA1 y dos proteasas intracelulares (Grinyer y col.,

2005). Recientemente, Szabó y col. (2012) compararon los perfiles de expresión de numerosos genes de peptidasas de la cepa *T. harzianum* SZMC 1647, durante su interacción con huevos del nematodo *C. elegans*, y observaron que entre los genes que mostraban un aumento en su nivel de expresión, además de genes de quitinasas, se encontraban *pra1* y *asp1*, razón por la cual sugirieron que estas peptidasas podrían estar correguladas con las quitinasas y, a su vez, desempeñar un papel clave en el control biológico de nematodos.

En los últimos años, la posibilidad de realizar estudios a escala transcriptómica (secuenciación de ESTs, *arrays* de ADN, o secuenciación masiva) ha contribuido significativamente a la identificación de nuevos genes de *Trichoderma* spp. asociados con su capacidad antagonista, incluyendo, en la cepa *T. harzianum* CECT 2413, algunos que codifican para proteasas extracelulares (Suárez y col., 2007). Asimismo, mediante la secuenciación de ESTs (Seidl y col., 2009b) y la secuenciación de ARN (Reithner y col., 2011), se ha podido confirmar la inducción de los genes *papA* y *pra1* como parte de la respuesta transcriptómica de *T. atroviride* durante la interacción micoparásita con *R. solani*. Además, la reciente secuenciación de los genomas de *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens*, ha puesto de manifiesto la existencia de uno de los más vastos arsenales de proteasas fúngicas descritos hasta ahora, con un total de 383, 445 y 479 genes, respectivamente, que codifican en su mayoría para aspartil- serín- (tipo subtilisinas), dipeptidil- y tripeptidil-peptidasas (Druzhinina y col., 2012).

En la presente Tesis Doctoral hemos analizado la respuesta transcriptómica de la cepa *T. harzianum* CECT 2413 en un modelo de interacción *Trichoderma*-tomate en comparación con otras condiciones de crecimiento y hemos observado que la expresión de la aspartil-peptidasa ASP1 aumenta de forma significativa en esta interacción (Capítulo I de esta Memoria; Samolski y col., 2009). Esto nos llevó a pensar que ASP1, además de su potencial implicación en el control biológico de hongos y nematodos, podría desempeñar un papel activo en alguna etapa del establecimiento de la asociación simbiótica *Trichoderma*-planta, bien para la obtención de nutrientes, penetración y colonización del tejido vegetal; la protección de las hifas frente a proteínas antifúngicas secretadas por la propia planta hospedadora durante la invasión del tejido; o bien modulando las respuestas de defensa de la planta hospedadora frente a un posible ataque de organismos fitopatógenos. En este sentido, las proteasas producidas por las especies de *Trichoderma* podrían actuar directamente sobre las plantas activando respuestas de defensa, MTI o ETI, al ser reconocidas como MAMPs o como efectores,

respectivamente, o bien, indirectamente mediante la generación de DAMPs. En este contexto, en el presente Capítulo se aborda la caracterización funcional del gen *asp1*, con especial énfasis en su efecto sobre la respuesta inmune de la planta.

RESULTADOS

1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DE CEPAS DE *T. harzianum* CECT 2413 QUE SOBREENPRESAN EL GEN *asp1*

La sobreexpresión del gen de la aspartil-peptidasa *asp1* se basó en la integración al azar de copias adicionales de la ORF de este gen en el genoma de la cepa *T. harzianum* CECT 2413. En los siguientes apartados se analizan los transformantes obtenidos en este proceso.

1.1. Obtención y verificación genotípica de los transformantes

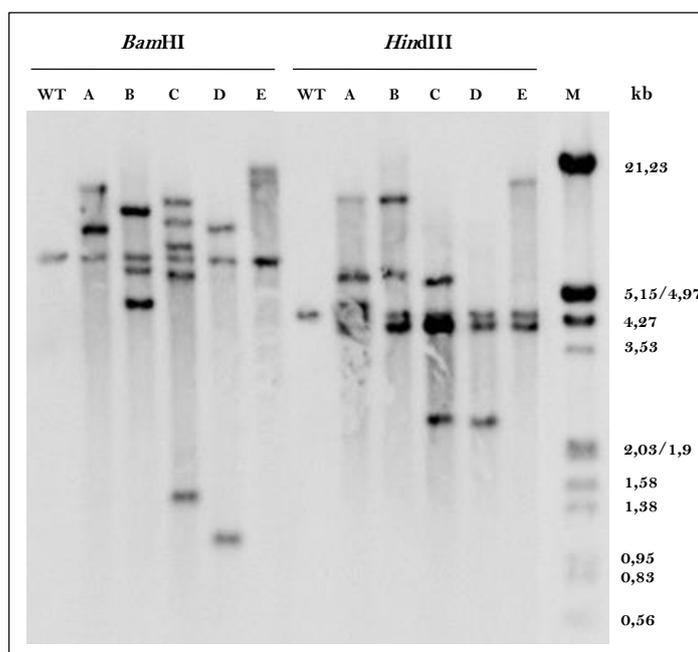
Con el fin de sobreexpresar el gen *asp1* en la cepa *T. harzianum* CECT 2413 se obtuvieron protoplastos de dicha cepa y se transformaron utilizando el plásmido recombinante pJL43b1-*asp1* (**Figura 57**), que porta la ORF del gen *asp1* bajo el dominio del promotor constitutivo P_{gpdA} y el gen *ble* de resistencia a fleomicina como marcador de selección. El proceso de construcción de este plásmido se describe detalladamente en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos.

Como resultado de la transformación de protoplastos se obtuvieron un total de 18 regenerantes estables tras rondas sucesivas de crecimiento alternando medios con y sin selección. Para comprobar la incorporación del casete de expresión en el genoma de los regenerantes obtenidos, se realizó un primer escrutinio por PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos gpdIF/2088IR (amplifica un fragmento de 1,1 kb del casete de expresión que incluye una porción del promotor P_{gpdA} y otra del gen *asp1*) y 2088I/pAN52-trpH-3' (amplifica una región de 1,1 kb que incluye parte de la ORF de *asp1* y el terminador T_{trpC} completo). El análisis mediante electroforesis de los productos de PCR obtenidos confirmó la presencia del casete de expresión P_{gpdA}:*asp1* en 5 (27,7%) de los regenerantes (datos no mostrados), que se denominaron preliminarmente A, B, C, D y E.

La verificación genotípica de los cinco transformantes obtenidos se completó mediante análisis tipo *Southern*. Para determinar el número de inserciones ectópicas del casete de expresión en el genoma de las cepas transformadas se digirió ADN genómico de cada cepa con la enzima *Bam*HI, cuya diana se encuentra en un solo sitio del plásmido pJL43b1-*asp1* (fuera del gen *asp1*; **Figura 57**) y se hibridó con una sonda que contenía un fragmento de la ORF del gen *asp1*. Como se muestra en la **Figura 25**,

todos los transformantes, salvo el E, presentaron bandas adicionales a la copia endógena del gen *asp1*, que indicaron diversos sitios de integración ectópica. En el caso del transformante E, teniendo en cuenta que la banda de hibridación detectada estaba a la altura de la correspondiente a la copia endógena, pero presentaba una mayor intensidad que en el resto de cepas analizadas, cabía la posibilidad de que se tratara de la superposición de dos bandas, una correspondiente al gen endógeno y la otra a una inserción ectópica. Por otro lado, la digestión de las muestras de ADN con la enzima *Hind*III (cuyo corte libera un fragmento de 4,2 kb del vector pJL43b1-*asp1* correspondiente al casete de expresión completo: promotor, ORF de *asp1* y terminador; **Figura 57**), y posterior hibridación con la misma sonda que en el caso anterior, permitió observar, además de la banda correspondiente a la copia endógena del gen *asp1*, una banda esperada de 4,2 kb, que confirmó la integridad del casete de expresión dentro del genoma de todos los transformantes. La distinta intensidad de dicha banda en cada transformante indicaba que estos habían incorporado un distinto número de copias completas del casete de expresión de *asp1*. Además, se detectaron otras bandas, tanto de mayor como de menor tamaño respecto al esperado, que sugieren posibles reorganizaciones e inserciones de copias truncadas dentro del genoma.

Figura 25. Análisis tipo *Southern* para verificar la integración del casete de expresión P*gpdA*:*asp1* en el genoma de cinco transformantes de *T. harzianum* CECT 2413 (A-E). Cada carril contiene 10 µg de ADN genómico digerido con la enzima de restricción *Bam*HI, de corte único dentro del plásmido pJL43b1-*asp1*; o con la enzima *Hind*III, cuyo corte libera el casete de expresión (**Figura 57** de Materiales y Métodos). Como sonda se utilizó un fragmento de 0,4 kb de la ORF del gen *asp1*, amplificado con los oligonucleótidos pSIL6281-f1 y pSIL6281-r1 y marcado con digoxigenina. M, marcador de peso molecular λ *Eco*RI/*Hind*III; WT, cepa silvestre.



1.2. Análisis de expresión a nivel de ARNm y de proteína

Con el fin de analizar el grado de sobreexpresión del gen *asp1* en los transformantes obtenidos, se llevó a cabo un análisis tipo *Northern*. Para ello, se recogió el micelio de la cepa silvestre y de los transformantes A, B, C, D y E cultivados 48 h en medio MM, según se indica en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos, utilizando glucosa como fuente de carbono. En estas condiciones de cultivo se sabe que no hay expresión de la copia endógena de *asp1*, ya que este gen está sometido a represión catabólica (Suárez y col., 2005).

Como se muestra en la **Figura 26**, todas las cepas analizadas, excepto la WT, presentaron altos niveles de expresión de *asp1*, siendo el transformante B el que mostró un mayor nivel de ARNm. Los transformantes B y E se seleccionaron para estudios posteriores, con los nombres ASP1T1 y ASP1T2, respectivamente.

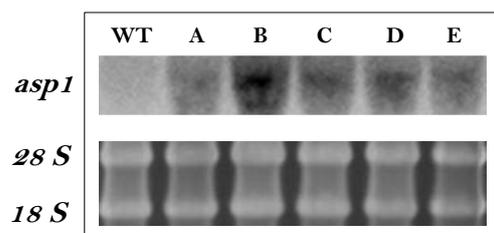


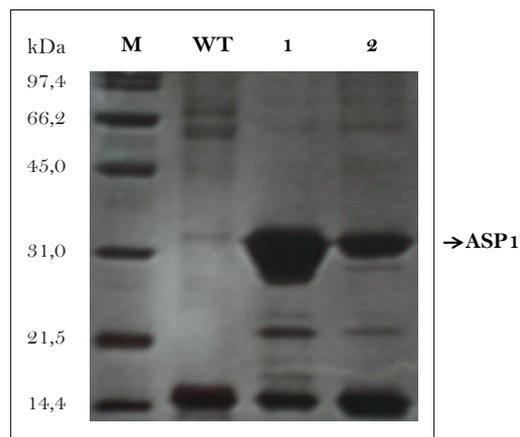
Figura 26. Análisis tipo *Northern* de la cepa silvestre (WT) y cepas transformantes (A-E) de *T. harzianum* CECT 2413 que sobreexpresan el gen *asp1*. Cada carril contiene 20 µg de ARN total extraído de micelio cultivado durante 48 h en medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v) (según se describe en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos). Como sonda se utilizó un fragmento de 0,4 kb de la ORF del gen *asp1*, obtenido por PCR con los oligonucleótidos pSIL6281-f1 y pSIL6281-r1 y marcado con digoxigenina. Como control de carga se muestra la tinción del gel de agarosa con BrEt.

Con objeto de verificar si los transformantes seleccionados, ASP1T1 y ASP1T2, sobreexpresaban *asp1* a nivel de proteína, se analizó mediante SDS-PAGE el perfil de proteínas secretadas por la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y los transformantes en estudio. Para ello, se recogieron los sobrenadantes de cultivo de las distintas cepas tras su crecimiento durante 48 h en medio MM, según se indica en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos, utilizando glucosa como fuente de carbono (como se indicó anteriormente, la expresión de la copia endógena de *asp1* está sometida a represión catabólica por lo que no se expresa en estas condiciones).

Como se muestra en la **Figura 27**, en los perfiles proteicos de las cepas ASP1T1 y ASP1T2 se observó una banda mayoritaria del tamaño esperado para la

peptidasa ASP1 (33 kDa), que apenas era visible en la cepa WT. De acuerdo con los resultados del *Northern blot*, el mayor nivel de proteína se observó en la cepa ASP1T1 (transformante B). Otras bandas de menor peso molecular (22-23 kDa), que podrían corresponder a productos de degradación de la proteína mayoritaria y/o de otras proteínas, tampoco se observaron en la cepa WT.

Figura 27. Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas al medio de cultivo por la cepa silvestre (WT) y las cepas transformantes de *T. harzianum* CECT 2413 que sobreexpresan *asp1* (1: ASP1T1; 2: ASP1T2), tras 48 h de crecimiento en medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v). Los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. En cada carril se cargaron 15 μ L de sobrenadante concentrado (20x). M, marcador de peso molecular.



1.3. Análisis de actividad proteolítica

Con objeto de determinar en qué medida se había incrementado la actividad proteolítica ASP1 en los transformantes obtenidos, ASP1T1 y ASP1T2, se midió la actividad proteolítica en los mismos sobrenadantes de cultivo utilizados en el análisis del apartado anterior.

Como se muestra en la **Figura 28**, la actividad proteolítica detectada en los sobrenadantes de las cepas transformantes se vio claramente incrementada respecto a la de la cepa silvestre. En términos de actividad proteolítica total –unidades de enzima por mL de solución (U/mL)–, los transformantes ASP1T1 y ASP1T2 presentaron un aumento de 96 y 51 veces, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos a nivel de ARNm y de proteína en el apartado anterior, confirmando que de los dos transformantes, ASP1T1 es el que presenta un mayor grado de sobreexpresión de *asp1*. Por otra parte, en términos de actividad proteolítica específica –unidades de enzima por mg de proteína total (U/mg)– ambos transformantes presentaron un incremento de aproximadamente 9,5 veces respecto a la actividad de la cepa silvestre.

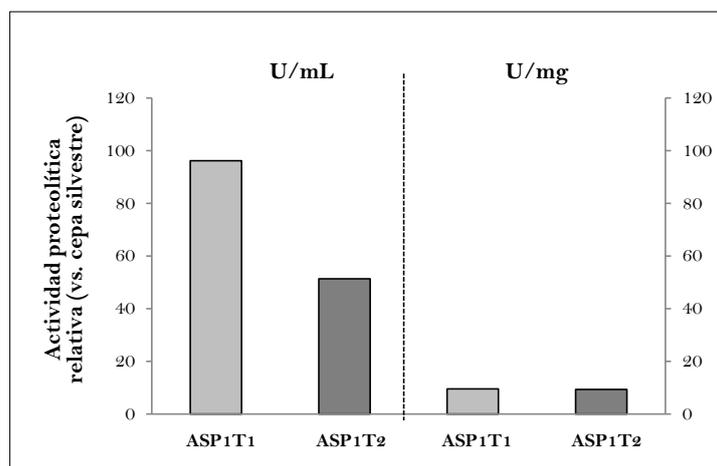


Figura 28. Actividad proteolítica total (U/mL) y específica (U/mg) medida en los sobrenadantes de cultivo de las cepas transformantes de *T. harzianum* CECT 2413 que sobreexpresan la peptidasa ASP1 (ASP1T1 y ASP1T2), respecto a la actividad de la cepa silvestre. Los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron tras 48 h de crecimiento en medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v), según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. El ensayo de actividad proteolítica se llevó a cabo en condiciones de pH (2,5) y temperatura (50°C) óptimas (ver apartado 3).

1.4. Ensayos de crecimiento en placa

Por último, con objeto de analizar si la sobreexpresión del gen *asp1* afectaba a la capacidad de crecimiento de las cepas obtenidas, se realizaron ensayos de crecimiento en placa en medio PDA (apartado 10.3 de Materiales y Métodos), en comparación con la cepa silvestre.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la tasa de crecimiento de las cepas en estudio. Tampoco se observaron cambios fenotípicos con relación a la producción de micelio aéreo, pigmentación, esporulación y morfología de las colonias.

2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DE CEPAS DE *T. harzianum* CECT 2413 QUE SILENCIAN EL GEN *asp1*

El silenciamiento génico mediado por ARN es un complejo sistema de regulación que se induce en células eucariotas en respuesta a la producción, deliberada o fortuita, de moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc), y que conduce a la supresión de la expresión génica por degradación del ARNm diana, el bloqueo de su traducción, o la inhibición de su transcripción.

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) se ha convertido en una herramienta fundamental en el estudio de la función de los genes en especies

recalcitrantes al reemplazamiento génico como es el caso del hongo *T. harzianum*. En la presente Tesis, con el fin de estudiar la función del gen *asp1* en la cepa *T. harzianum* CECT 2413 se construyó un plásmido recombinante (pSIL-*asp1*) que portaba un casete de silenciamiento adecuado para inducir la formación de moléculas de ARNm autocomplementarias y silenciar la expresión del gen *asp1*. En los siguientes apartados se analizan los transformantes obtenidos tras la integración al azar de este casete en el genoma de la cepa *T. harzianum* CECT 2413.

2.1. Obtención y verificación genotípica de los transformantes

Con el propósito de silenciar la expresión del gen *asp1* en la cepa *T. harzianum* CECT 2413 se obtuvieron protoplastos de dicha cepa y se cotransformaron utilizando el plásmido pSIL-*asp1*, como portador del casete de silenciamiento (**Figura 58**), y el plásmido pAN7-1, como portador del gen *hph* de resistencia a higromicina como marcador de selección (**Figura 49**). El proceso de construcción del plásmido recombinante pSIL-*asp1* se describe detalladamente en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. Para facilitar el proceso de recombinación, los plásmidos pSIL-*asp1* y pAN71 se linearizaron previamente por digestión con las enzimas de restricción *Hind*III y *Kpn*I, las cuales presentan un solo sitio de corte dentro de cada plásmido, respectivamente (**Figuras 49 y 58**).

Como resultado de la cotransformación de protoplastos se obtuvieron un total de 47 regenerantes estables, tras rondas sucesivas de crecimiento alternando medios con y sin selección. Para comprobar la incorporación del casete de silenciamiento en el genoma de los regenerantes, se realizó un primer escrutinio por PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos psil-Prom/Int R (amplifica una región de 0,7 kb que incluye parte del promotor Pta, el fragmento del gen *asp1* en orientación sentido y parte del intrón que separa los dos fragmentos de ambos insertos) e Int F/psil-Ter (amplifica una región de 1,2 kb que incluye parte del intrón, el fragmento del gen *asp1* en orientación antisentido y parte del terminador Tcbh2). El análisis mediante electroforesis de los productos de PCR obtenidos confirmó que 3 (6,4%) de los regenerantes analizados incorporaron el fragmento del gen *asp1* en orientación sentido y que solo 2 (4,3%) de ellos (denominados A y B) también habían incorporado el fragmento en orientación antisentido (datos no mostrados).

La verificación genotípica de estos dos transformantes se completó mediante análisis tipo *Southern*. Para determinar el número de inserciones del casete de

silenciamiento se digirió ADN genómico de cada cepa con la enzima *XhoI*, cuya diana se encuentra en un solo sitio del vector pSIL-*asp1* (fuera de la ORF de *asp1*; **Figura 58**), y se hibridó con una que contenía un fragmento de la ORF del gen *asp1*.

Como se muestra en la **Figura 29**, además de la banda de ADN correspondiente a la copia endógena del gen *asp1*, se observaron bandas adicionales, indicando la existencia de varios sitios de integración. En el caso del transformante A, teniendo en cuenta que la banda de hibridación detectada a la altura del gen endógeno presentaba una mayor intensidad que en el WT o la cepa B, cabía la posibilidad de que se tratara de la superposición de dos o más bandas, una correspondiente al gen endógeno y otras a inserciones ectópicas.

Por otro lado, la digestión de las muestras de ADN con la enzima *SalI* (cuyo corte libera un fragmento de 0,9 kb del vector pSIL-*asp1* que incluye los insertos del gen *asp1* en orientaciones invertidas; **Figura 58**) y posterior hibridación con la misma sonda que en el caso anterior, permitió observar, además de la banda correspondiente a la copia endógena del gen *asp1*, una banda esperada de 0,9 kb, que confirmó la integridad del casete de silenciamiento dentro del genoma de ambos transformantes. La mayor intensidad de la banda esperada en el transformante B indicaba que este había incorporado un número mayor de copias completas del casete de silenciamiento dentro de su genoma. Además, en el transformante B se detectaron otras bandas de mayor tamaño que sugieren posibles reorganizaciones dentro del genoma.

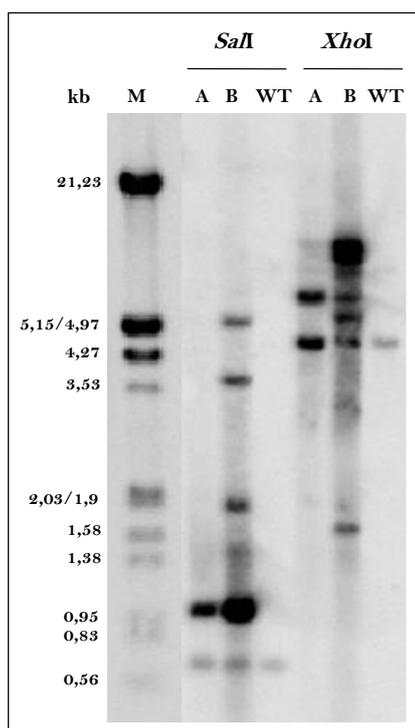


Figura 29. Análisis tipo *Southern* para verificar la integración del casete de silenciamiento del gen *asp1* en el genoma de dos transformantes de *T. harzianum* CECT 2413 (A y B). Cada carril contiene 10 µg de ADN genómico digerido con: la enzima de restricción *SalI*, cuyo corte dentro del vector pSil-*asp1* libera un fragmento del casete de silenciamiento; o con la enzima *XhoI*, de corte único dentro del plásmido pSil-*asp1* (**Figura 58** de Materiales y Métodos). Como sonda se utilizó el fragmento de 0,4 kb de la ORF del gen *asp1* utilizado como inserto, amplificado con los oligonucleótidos pSIL6281-f1 y pSIL6281-r1 y marcado con digoxigenina. M, marcador de peso molecular λ *EcoRI/HindIII*; WT, cepa silvestre.

2.2. Análisis de expresión a nivel de ARNm y de proteína

Con el fin de determinar el grado de silenciamiento del gen *asp1* en los transformantes obtenidos a partir de la cepa *T. harzianum* CECT 2413, se llevó a cabo un análisis tipo *Northern*. Para ello, se recogió el micelio de la cepa silvestre y de los transformantes A y B cultivados 48 h en medio MM, según se indica en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos, utilizando paredes celulares del oomiceto fitopatógeno *Phytium ultimum* como fuente de carbono (se sabe que la expresión de *asp1* es fuertemente inducida a las 4 h de cultivo por la presencia de paredes celulares de hongos y oomicetos; Suárez y col., 2005). Para garantizar la detección únicamente de los niveles endógenos de *asp1* se utilizó como sonda un fragmento de la ORF de *asp1* distinto al utilizado en el casete de silenciamiento.

Como se muestra en la **Figura 30**, no se detectó expresión de *asp1* en los transformantes analizados ni a las 4 ni a las 24 h de cultivo. Por el contrario, como cabía esperar, en la cepa silvestre se observó expresión de *asp1* a las 4 h de cultivo. En ambos transformantes se detectó una cola de degradación de ARNm (más intensa en el caso del mutante B) que confirmaba el silenciamiento post-transcripcional de *asp1*. Los transformantes A y B fueron por tanto seleccionados para estudios posteriores y se denominaron ASP1Sil1 y ASP1Sil2, respectivamente.

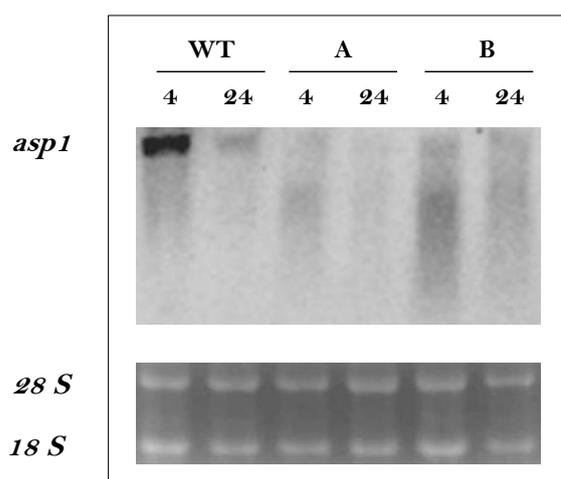


Figura 30. Análisis tipo *Northern* de la cepa silvestre (WT) y cepas transformantes de *T. harzianum* CECT 2413 (A y B) que silencian el gen *asp1*. Cada carril contiene 20 μ g de ARN total extraído de micelio cultivado durante 4 y 24 h en medio MM suplementado con paredes celulares de *P. ultimum* al 1% (p/v) (según se describe en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos). Como sonda se utilizó un fragmento de 0,3 kb del extremo 3' de la ORF del gen *asp1* (región ausente en el casete de silenciamiento pSil-*asp1*), amplificado con los oligonucleótidos 2088I y 6281Rv y marcado con fósforo radiactivo (32 P). Como control de carga se muestra la tinción del gel de agarosa con BrEt.

Con objeto de verificar si los transformantes ASP1Sil1 y ASP1Sil2 silenciaban la expresión de *asp1* a nivel de proteína, se analizó mediante SDS-PAGE el perfil de proteínas secretadas por la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y los transformantes en estudio. Para ello, se recogieron los sobrenadantes de cultivo de las distintas cepas tras su crecimiento durante 48 h en medio MM, según se indica en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos, utilizando como fuente de carbono paredes celulares del hongo fitopatógeno *R. solani* (como se indicó anteriormente, la expresión de *asp1* es fuertemente inducida en estas condiciones).

Como se muestra en la **Figura 31A**, en el perfil proteico de la cepa silvestre se observó una banda del tamaño esperado para la peptidasa ASP1 (33 kDa), cuya intensidad estaba notablemente disminuida en los transformantes ASP1Sil1 y ASP1Sil2. Por el contrario, otras bandas de menor peso molecular presentaron mayor intensidad en el perfil de los transformantes.

Con el fin de confirmar que esta banda proteica era ASP1 se llevaron a cabo análisis tipo *Western*, utilizando un anticuerpo policlonal obtenido frente a esta aspartil-peptidasa (según se describe en el apartado 8.7 de Materiales y Métodos). Como se muestra en la **Figura 31B**, el análisis *Western* confirmó que la proteína de 33 kDa observada en la cepa silvestre era la misma cuya intensidad disminuía en ambas cepas transformantes, siendo el transformante ASP1Sil2 el que mostró una menor cantidad de la misma, resultado que está de acuerdo con la mayor intensidad de la cola de degradación detectada en el análisis de expresión y que indica un mayor grado de silenciamiento.

Con el propósito de estimar el grado de silenciamiento en cada transformante, se comparó la cantidad de proteína producida por estos con diluciones seriadas de la proteína producida por la cepa silvestre. Como se muestra en la **Figura 31C**, los transformantes ASP1Sil1 y ASP1Sil2 secretaron menos del 5% de la cantidad total de proteína producida por la cepa silvestre, resultado que indicaba que el grado de silenciamiento del gen *asp1* en ambos transformantes era superior al 95%.

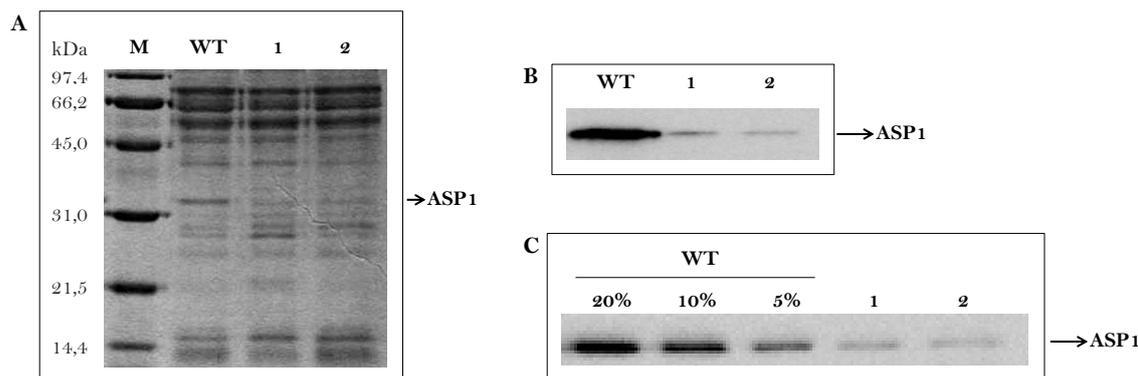


Figura 31. A: Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas al medio de cultivo por la cepa silvestre (WT) y las cepas transformantes de *T. harzianum* CECT 2413 que silencian el gen *asp1* (1: ASP1Sil1; 2: ASP1Sil2), tras 24 h de crecimiento en medio MM suplementado con paredes celulares de *R. solani* al 1% (p/v). Los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. En cada carril se cargaron 3 μ g de proteína total. B y C: Análisis tipo *Western* para la inmunodetección de la aspartil-peptidasa ASP1 en los sobrenadantes de cultivo obtenidos en presencia de paredes celulares de *R. solani*, mediante el uso de un anticuerpo policlonal obtenido frente a ASP1. En C se estimó el grado de silenciamiento del gen *asp1* en los mutantes en estudio utilizando diferentes diluciones del sobrenadante de cultivo de la cepa silvestre a modo de patrón de referencia.

2.3. Análisis de actividad proteolítica

Con objeto de determinar en qué medida se había reducido la actividad proteolítica en los transformantes que silencian ASP1 (ASP1Sil1 y ASP1Sil2), se midió dicha actividad en los mismos sobrenadantes de cultivo utilizados en el análisis tipo *Western* del apartado anterior.

Como se muestra en la **Figura 32**, la actividad proteolítica detectada en las cepas transformantes se vio notablemente disminuida respecto a la de la cepa silvestre. En términos de actividad proteolítica total –unidades de enzima por mL de solución (U/mL)–, los transformantes ASP1Sil1 y ASP1Sil2 presentaron entre 1,6 y 4 veces menos actividad que la cepa silvestre, respectivamente. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en el *Western blot*, confirmando que el transformante ASP1Sil2 presenta un grado de silenciamiento mayor que el del transformante ASP1Sil1. Por otra parte, en términos de actividad proteolítica específica –unidades de enzima por mg de proteína total (U/mg)– ambos transformantes presentaron aproximadamente dos veces menos actividad que la cepa silvestre.

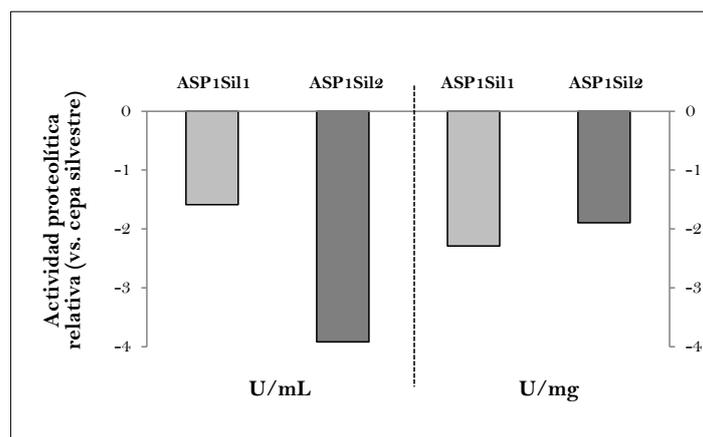


Figura 32. Actividad proteolítica total (U/mL) y específica (U/mg) de los sobrenadantes de cultivo de las cepas transformantes de *T. harzianum* CECT 2413 que silencian la proteína ASP1 (ASP1Sil1 y ASP1Sil2), respecto a la actividad de la cepa silvestre. Los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron tras 24 h de crecimiento en medio MM suplementado con paredes celulares de *R. solani* al 1% (p/v), según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. El ensayo de actividad proteolítica se llevó a cabo en condiciones de pH (2,5) y temperatura (50°C) óptimas (ver apartado 3).

2.4. Ensayos de crecimiento en placa

Por último, para conocer si el silenciamiento del gen *asp1* afectaba a la capacidad de crecimiento de las cepas obtenidas, se realizaron ensayos de crecimiento en placa en medio PDA (apartado 10.1 de Materiales y Métodos), en comparación con la cepa silvestre.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la tasa de crecimiento de las cepas en estudio. Tampoco se observaron cambios fenotípicos con relación a la producción de micelio aéreo, pigmentación, esporulación y morfología de las colonias.

3. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ASP1: TEMPERATURA Y pH

Con objeto de determinar las condiciones óptimas de temperatura y pH a las que actúa la aspartil-peptidasa ASP1, se llevaron a cabo ensayos de actividad proteolítica utilizando como solución enzimática sobrenadantes de cultivo del transformante ASP1T1, que sobreexpresa dicha proteína.

3.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la peptidasa ASP1

Los ensayos de actividad proteolítica se llevaron a cabo en un rango de temperaturas de 30°C-70°C. Como se muestra en la **Figura 33**, la actividad de ASP1 fue máxima a 50°C y a medida que se fue incrementando la temperatura del ensayo la actividad se redujo progresivamente.

Para analizar la influencia de la temperatura sobre la estabilidad de ASP1 se preincubó la solución enzimática en un rango de temperaturas de 30°C-70°C, y posteriormente el ensayo se llevó a cabo a la temperatura de actividad máxima (50°C). Como se muestra en la **Figura 33**, la actividad de ASP1 se redujo drásticamente tras preincubar la solución enzimática a temperaturas superiores a 37°C. Se calculó una temperatura media de inactivación –temperatura en la que se conserva el 50% de actividad– de aproximadamente 39°C. No se detectó actividad proteolítica residual al preincubar la solución enzimática a 50°C o a temperaturas superiores, indicando que la inactivación de la proteína ocurre tras 20 min a una temperatura entre 40-50°C.

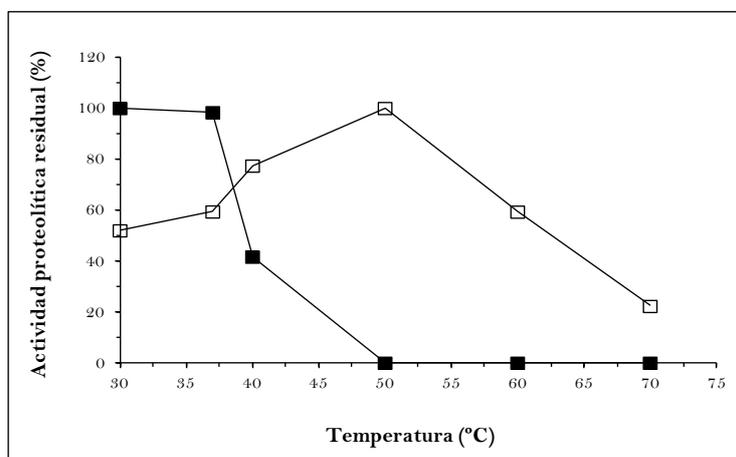


Figura 33. Efecto de la temperatura sobre la actividad (□) y estabilidad (■) de la aspartil-peptidasa ASP1 de *T. harzianum* CECT 2413. El ensayo de actividad proteolítica se realizó utilizando caseína como sustrato, a pH 2,5 y diferentes temperaturas. Para estudiar la estabilidad de la enzima el ensayo se realizó a 50°C y pH 2,5, preincubando la solución enzimática a diferentes temperaturas durante 20 min. El 100% de actividad corresponde a la máxima actividad alcanzada en cada caso.

3.2. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la peptidasa ASP1

Los ensayos de actividad proteolítica se realizaron en un rango de pHs de 1,5-7,0. Como se muestra en la **Figura 34**, la actividad de ASP1 fue máxima a pH 2,5. Cuando el ensayo se realizó a pH 2,0 la actividad se redujo en un 70%. A pH 1,5 prácticamente no se detectó actividad. A medida que se incrementó el pH del ensayo la actividad se redujo progresivamente, siendo indetectable a pH 6,0 o pHs superiores.

Para analizar la influencia del pH sobre la estabilidad de ASP1 se preincubó la solución enzimática en un rango de pHs de 1,5-7,0, y posteriormente el ensayo se llevó a cabo a pH óptimo (2,5). Como se muestra en la **Figura 34**, la actividad proteolítica se mantuvo prácticamente constante en un amplio rango de pH (2,0-6,0). Sin embargo, no se detectó actividad proteolítica residual al preincubar la solución enzimática a pHs fuera de ese rango, indicando que la inactivación de la proteína ocurre a pHs menores de 2,0 y mayores de 6,0.

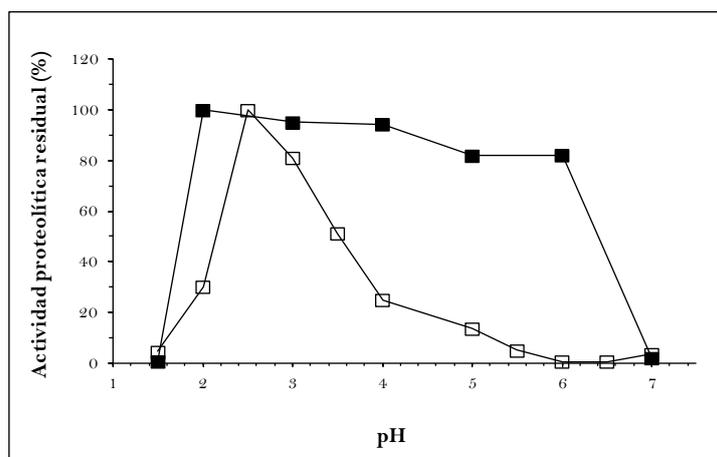


Figura 34. Efecto del pH sobre la actividad (□) y estabilidad (■) de la aspartil-peptidasa ASP1 de *T. harzianum* CECT 2413. El ensayo de actividad proteolítica se realizó utilizando caseína como sustrato, a 50°C y diferentes pHs. Para estudiar la estabilidad de la enzima el ensayo se realizó a 50°C y pH 2,5, preincubando la solución enzimática a 4°C y diferentes pHs durante 24 h. El 100% de actividad corresponde a la máxima actividad alcanzada en cada caso.

4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *T. harzianum*

Con el propósito de estudiar la posible participación de la aspartil-peptidasa ASP1 en la actividad antifúngica de *T. harzianum* CECT 2413, se llevaron a cabo diferentes ensayos comparando la cepa silvestre y las cepas transformantes que sobreexpresan (ASP1T1 y ASP1T2) o silencian (ASP1Sil1 y ASP1Sil2) el gen *asp1*.

4.1. Ensayos *in vitro*

Con objeto de evaluar el efecto antifúngico de la aspartil-peptidasa ASP1 frente a *Botrytis cinerea* se llevaron a cabo ensayos *in vitro* utilizando concentrados de proteínas secretadas por la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y por la cepa que sobreexpresa ASP1 (ASP1T1), tras 48 h de crecimiento en medio MM con glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono (en esta condición de cultivo la cepa transformante ASP1T1 secreta mayoritariamente la aspartil-peptidasa ASP1, sin embargo, no hay expresión de la copia endógena del gen *asp1* en ninguna de las cepas). El perfil de proteínas de los concentrados proteicos (20x) tanto de la cepa silvestre como de la cepa transformante se mostró en el apartado 1.2 del presente Capítulo (**Figura 27**).

Los ensayos antifúngicos se realizaron en microplacas de 96 pocillos (según se describe en el apartado 10.4.2 de Materiales y Métodos) con medio líquido PDB suplementado con los concentrados proteicos a una concentración final 2x, 10x y 20x. En ningún caso se observó inhibición del crecimiento de las germínulas de *B. cinerea* respecto a la condición control (PDB sin suplementar) cuando se utilizaron los concentrados proteicos 2x. Sin embargo, los concentrados 10x y 20x inhibieron el crecimiento de las germínulas de *B. cinerea*, y lo hicieron en mayor medida en el caso de los concentrados proteicos obtenidos de la cepa transformante ASP1T1, observándose germínulas más cortas que tendían a agregarse en el centro del pocillo. En la **Figura 35** se muestra el aspecto de las germínulas de *B. cinerea* después de 12 h en presencia de concentrados proteicos 20x.

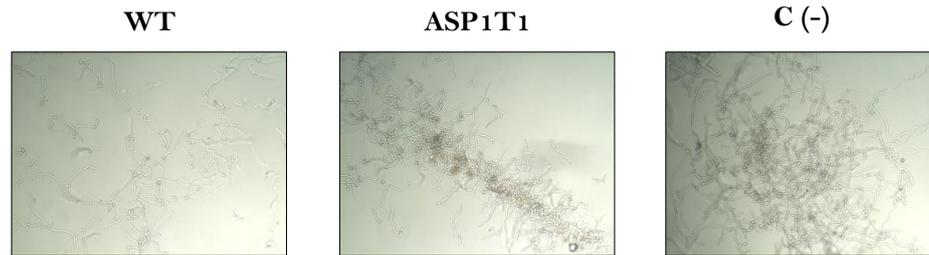


Figura 35. Imágenes representativas del efecto antifúngico de concentrados de proteínas secretadas por cepas de *T. harzianum* (WT, cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413; ASP1T1, transformante que sobreexpresa *asp1*) sobre germínulas del hongo fitopatógeno *B. cinerea*. Los concentrados proteicos se obtuvieron según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos, tras 48 h de crecimiento de *T. harzianum* en presencia de glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono. El perfil de proteínas producidas por las distintas cepas de *T. harzianum* en esta condición de cultivo se muestra en la Figura 27. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación según se describe en el apartado 10.4.2 de Materiales y Métodos. Cada pocillo contenía: 48 μ L del concentrado proteico (concentración final 20x), 4 μ L de medio líquido PDB 5x y 8 μ L de una suspensión de 800 esporas de *B. cinerea*. Las placas se incubaron a 22°C en oscuridad durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se evaluó la elongación de los tubos germinativos. C(-), control negativo con agua ultrapura estéril en sustitución del concentrado proteico.

4.2. Ensayos *in vivo*

Por un lado, se evaluó la capacidad de las cepas en estudio para antagonizar el crecimiento de hongos fitopatógenos mediante ensayos de enfrentamiento en cultivo dual (apartado 10.4.1 de Materiales y Métodos). Como se muestra en la **Figura 36**, la cepa silvestre de *T. harzianum* fue capaz de rodear y controlar el crecimiento de las colonias de *B. cinerea* y *Colletotrichum acutatum*, sobrecreciendo por completo la colonia del patógeno en el caso de *B. cinerea*. Sin embargo, no se observaron diferencias entre el comportamiento de la cepa silvestre y el de las cepas transformantes que sobreexpresaban o silenciaban *asp1*, cuando estas últimas se enfrentaron a los mismos hongos (imágenes no mostradas).

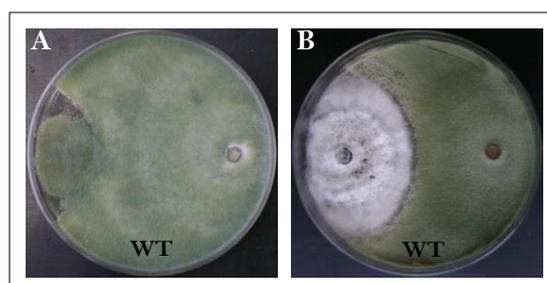


Figura 36. Enfrentamientos en cultivo dual de *T. harzianum* CECT 2413 (derecha en la placa) y hongos fitopatógenos (izquierda en la placa). A: *T. harzianum* vs. *B. cinerea*, crecimiento sobre la colonia del patógeno B: *T. harzianum* vs. *C. acutatum*, crecimiento rodeando la colonia del patógeno. Los enfrentamientos se realizaron en medio PDA, incubando las placas durante 15 días a 28°C en oscuridad.

Cuando los enfrentamientos se efectuaron con el hongo *R. solani*, se observó que las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresaban *asp1* eran sensiblemente mejores antagonistas que la cepa silvestre, y que esta, a su vez, controlaba el crecimiento de *R. solani* más eficientemente que los transformantes que silenciaban *asp1* (**Figura 37**). Este resultado indicaba que, al menos frente a *R. solani*, ASP1 parecía tener un papel activo en la capacidad antagonista de *T. harzianum*.

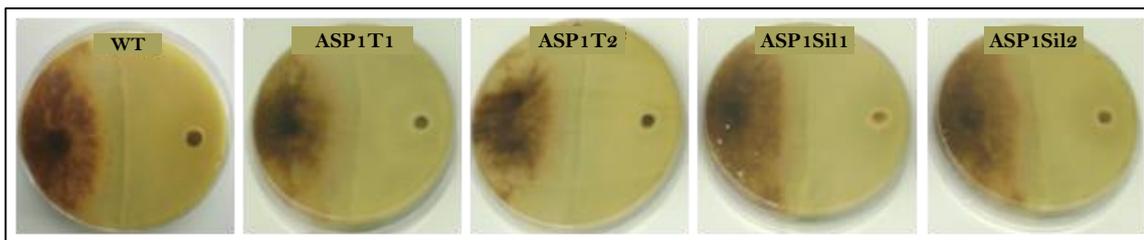


Figura 37. Enfrentamientos en cultivo dual de *T. harzianum* CECT 2413 (derecha en la placa) y el hongo fitopatógeno *R. solani* (izquierda en la placa). WT, cepa silvestre; ASP1T1 y ASP1T2, transformantes que sobreexpresan el gen *asp1*; ASP1Sil1 y ASP1Sil2, transformantes que silencian el gen *asp1*. Los enfrentamientos se realizaron en medio PDA incubando las placas durante 15 días a 28°C en oscuridad.

5. ENSAYOS DE PROTECCIÓN CELULAR: RESISTENCIA A COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS

Con objeto de evaluar si la aspartil-peptidasa ASP1 de *T. harzianum* CECT 2413 estaba participando en la protección celular de las hifas frente a proteínas antifúngicas secretadas por las plantas, se analizó la resistencia de la cepa silvestre y de las cepas que sobreexpresan o silencian *asp1* frente a exudados vegetales obtenidos según se describe en el apartado 10.2.2 de Materiales y Métodos.

Los resultados mostraron que los exudados vegetales no tuvieron efectos negativos en cuanto al porcentaje de germinación de esporas de las distintas cepas de *Trichoderma* analizadas, sin embargo sí se vio afectado el crecimiento de los tubos germinativos, observándose aglomeración de las germínulas así como tubos germinativos más cortos en comparación con la condición control (agua), si bien las cepas que sobreexpresan *asp1* (ASP1T1 y ASP1T2) mostraron mayor resistencia al efecto tóxico de los exudados que la cepa silvestre y que las cepas que silencian *asp1* (ASP1Sil1 y ASP1Sil2) (ejemplo en la **Figura 38**).

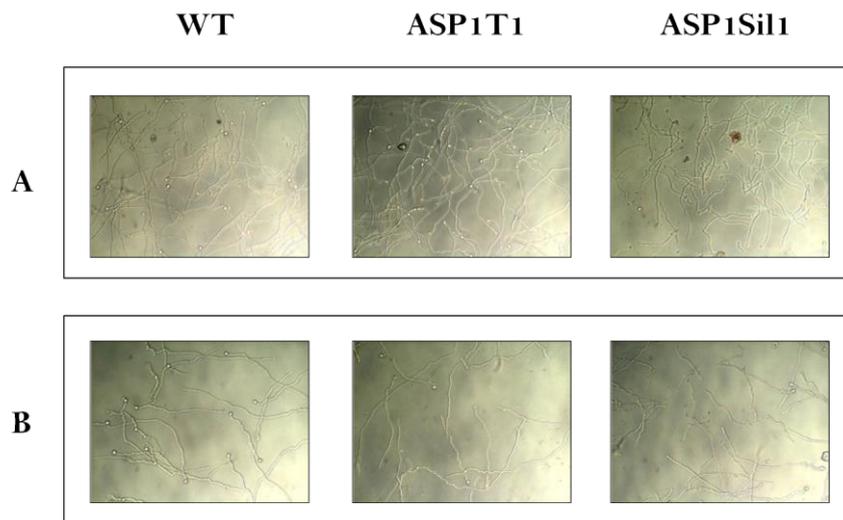


Figura 38. Imágenes representativas del efecto de exudados vegetales sobre cepas de *T. harzianum*. WT, cepa silvestre CECT 2413; ASP1T1, transformante que sobreexpresa *asp1*; ASP1Sil1, transformante que silencia *asp1*. A: germínulas de *T. harzianum* en presencia de exudados de raíces de plantas de pepino (obtenidos según se describe en el apartado 10.2.2 de Materiales y Métodos). B: germínulas de *T. harzianum* con agua ultrapura estéril en sustitución de los exudados vegetales (controles negativos). Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación según se describe en el apartado 10.2.2 de Materiales y Métodos. Cada pocillo contenía: 36 μ L de exudados vegetales, 4 μ L de medio PDB 5x y 20 μ L de una suspensión de 800 esporas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente. Los exudados vegetales se utilizaron a una concentración final 5x. La placa se incubó a 22°C en oscuridad durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se midió el porcentaje de germinación de esporas de las cepas fúngicas evaluadas y la elongación de los tubos germinativos.

6. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL GEN *asp1* EN LA INTERACCIÓN *Trichoderma*-PLANTA

6.1. Análisis de expresión del gen *asp1*

Como una primera aproximación para investigar un posible papel de *asp1* en la interacción *Trichoderma*-planta, se analizó su patrón de expresión mediante *Northern blot* en distintas condiciones, *in vivo* e *in vitro*, relacionadas con dicha interacción.

En primer lugar, se analizó la expresión de *asp1* en micelio de *T. harzianum* cultivado a distintos tiempos (4 h, 9 h y 24 h) en presencia de plántulas de pepino (sistema de interacción *Trichoderma*-planta descrito en el apartado 10.5.3.1 de Materiales y Métodos), en comparación con la presencia de una superficie inerte (fibras de nailon en sustitución del sistema radical de las plántulas), así como en medio basal PGM. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de *asp1* se induce rápidamente (4 h) en presencia de plántulas (**Figura 39A**; PGM+P), y el nivel de ARNm decae abruptamente a tiempos más largos. Un patrón de expresión similar se

observó en el medio que contenía fibras de nailon (**Figura 39A**; PGM+N). Por el contrario, no se encontraron niveles detectables de ARNm en medio basal PGM. Estos resultados sugieren que la expresión de *asp1* durante las primeras horas de interacción *Trichoderma*-planta podría ser promovida inespecíficamente tras el contacto del hongo con una superficie sólida cualquiera (bien raíces vegetales o fibras de nailon).

Cuando se analizó la expresión de *asp1* en micelio de *T. harzianum* cultivado en medio PGM con paredes celulares de raíces vegetales (sustrato insoluble), o con carboximetilcelulosa (sustrato soluble; componente principal de las paredes celulares vegetales) como fuente de carbono (los cultivos se realizaron según se describe en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos), se obtuvo un patrón de expresión similar al observado en el ensayo de interacción con plántulas *in vivo* únicamente en presencia de paredes celulares (comparar **Figura 39A**; PGM+P y **Figura 39B**; PGM+PCP y PGM+CMC), apoyando la idea de que la rápida inducción de esta peptidasa observada en PGM+P, PGM+N y PGM+PCP parecía responder al contacto de *T. harzianum* con un sustrato sólido.

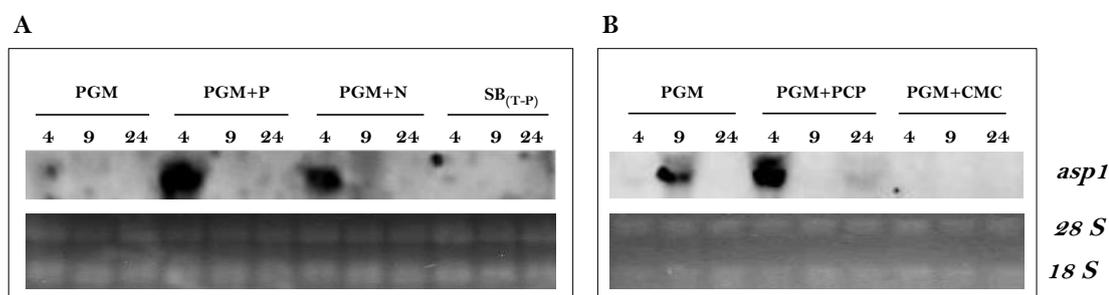


Figura 39. Análisis tipo *Northern* del gen *asp1* de *T. harzianum* CECT 2413. Cada carril contiene 20 μ g de ARN total extraído de micelio cultivado, según se describe en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos, durante 4, 9 y 24 h en medio PGM en distintas condiciones relacionadas con la interacción con plantas. A: medio PGM con plántulas de pepino (PGM+P) (sistema de interacción *Trichoderma*-planta descrito en el apartado 10.5.3.1 de Materiales y Métodos); medio PGM en el que se retiraron las plántulas de pepino y se sustituyeron por fibras de nailon (PGM+N) antes de la inoculación del medio con *T. harzianum*; medio PGM en el que se retiraron las plántulas de pepino antes de la inoculación del medio con *T. harzianum* (PGM); medio PGM donde previamente se había llevado a cabo un ensayo de interacción *Trichoderma*-planta según se indica en el texto [SB_(T-P)]. B: medio PGM suplementado con paredes celulares de raíces de plantas de pepino (PGM+PCP) al 1% (p/v); carboximetilcelulosa (PGM+CMC) al 0,5% (p/v); o glucosa al 0,1% (p/v) (PGM). Como sonda se utilizó un fragmento de 0,4 kb de la ORF del gen *asp1*, amplificado con los oligonucleótidos pSIL6281-f1 y pSIL6281-r1 y marcado con digoxigenina. Como control de carga se muestra una tinción del gel de agarosa con BrEt para visualizar el ARNr 28S y 18S.

Con el fin de comprobar si el diálogo químico que establecen hongo y planta durante su interacción tenía algún efecto en la expresión de *asp1*, se cultivó micelio de *T. harzianum* en medio PGM donde previamente se había realizado un ensayo de interacción *Trichoderma*-planta durante 24 h (el sobrenadante de este ensayo se recogió por filtración y se utilizó como medio de cultivo para estudiar la expresión de *asp1* en un nuevo cultivo de *T. harzianum* solo). Como se muestra en la **Figura 39A**, a diferencia de lo que ocurría con *qid74* (apartado 3.1 del Capítulo II), *asp1* no se expresó en este medio de cultivo (SB_{T-P}) a ninguno de los tiempos ensayados.

6.2. Competencia rizosférica

Con el propósito de evaluar la posible participación de la proteína ASP1 en la competencia rizosférica de *T. harzianum* CECT 2413, se analizó la capacidad de la cepa silvestre y de las cepas que sobreexpresan o silencian el gen *asp1* para colonizar raíces vegetales a nivel interno. Para ello, se cultivaron plántulas de pepino en presencia de germínulas de las cepas de *T. harzianum* en estudio (según se describe en el apartado 10.5.3.2 de Materiales y Métodos), observándose que a 10 hpi las germínulas de todas las cepas en estudio se encontraban profusamente adheridas a la superficie de las raíces, sin que se observaran diferencias de comportamiento entre cepas.

Para cuantificar el nivel de colonización en el interior de las raíces, se determinó la cantidad de ADN fúngico presente dentro del tejido radical mediante PCR a tiempo real. Para ello, previamente se retiró el micelio adherido a la superficie de las raíces, según se describe en el apartado 10.5.6 de Materiales y Métodos. Como se muestra en la **Figura 40**, a 120 hpi se detectó en todos los casos un aumento significativo en la cantidad de ADN fúngico, indicando la presencia de micelio activo capaz de crecer dentro del tejido radical, y este aumento fue notablemente mayor en el caso de las raíces tratadas con el transformante ASP1Sil2, las cuales presentaron aproximadamente 6,5 veces más ADN fúngico que la cepa silvestre.

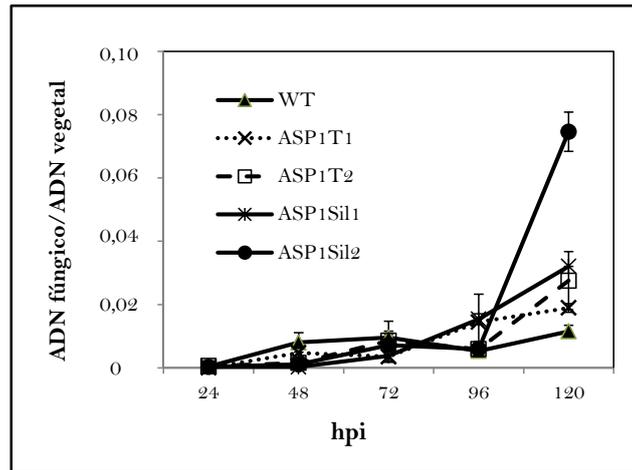


Figura 40. Análisis mediante PCR a tiempo real de la presencia de *T. harzianum* en el interior de raíces de plántulas de pepino. WT, cepa silvestre; ASP1T1 y ASP1T2, transformantes que sobreexpresan *asp1*; ASP1Sil1 y ASP1Sil2, transformantes que silencian *asp1*. Los ensayos de interacción *Trichoderma*-planta se realizaron con plántulas cultivadas en medio líquido PGM inoculado con germínulas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (según se describe en el apartado 10.5.6 de Materiales y Métodos). Los valores representados corresponden a la cantidad media de ADN de *T. harzianum* detectado en dos muestras (6 plantas/muestra) procedentes de experimentos independientes, utilizando los oligonucleótidos Q2413f y Q2413r. Como gen normalizador se utilizó el gen de la actina de *C. sativus*, amplificado con los oligonucleótidos CS-Factin y CS-Ractin. hpi, horas postinoculación.

6.3. Efecto sobre la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas

En primer lugar, con el propósito de evaluar si la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y las cepas que sobreexpresan o silencian *asp1* tenían algún efecto sobre la germinación de semillas y el crecimiento vegetal, se pildoraron semillas de tomate con una suspensión de esporas de la cepa fúngica correspondiente y se sembraron en cajas Magenta® con medio semisólido MS (apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). Tras 20 días de incubación no se observaron diferencias significativas entre las semillas pildoradas con la cepa silvestre y las semillas no pildoradas (control negativo), tanto a nivel de la tasa de germinación como a nivel de la longitud de la parte aérea de las plántulas (datos no mostrados). Tampoco se observaron diferencias significativas entre las semillas pildoradas con la cepa silvestre y las pildoradas con las cepas ASP1T1, ASP1T2, ASP1Sil1 y ASP1Sil2. Estos resultados indican que, en las condiciones ensayadas, *T. harzianum* CECT 2413 no parece tener efecto sobre la capacidad de germinación de las semillas de tomate, ni sobre el crecimiento de las plántulas, y que la sobreexpresión o silenciamiento del gen *asp1* en esta cepa no altera estos parámetros.

Por otro lado, también se examinó si la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y las cepas ASP1T1, ASP1T2, ASP1Sil1 y ASP1Sil2 tenían algún efecto sobre el

desarrollo del sistema radical. Para ello, se llevaron a cabo ensayos en medio semisólido MS y se evaluó el desarrollo de las raíces en plántulas de tomate (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). A 7 dpi se observó que tanto las raíces primarias como secundarias de las plántulas tratadas con la cepa silvestre eran significativamente más cortas que las raíces de las plántulas que no habían sido tratadas. La longitud de las raíces principales se redujo en un 43% y las secundarias en un 28% respecto al control negativo (plántulas sin tratar), mientras que el número de raíces secundarias no se vio afectado. Como se muestra en la **Figura 41**, al comparar el efecto de la cepa silvestre con el de las cepas que sobreexpresan o silencian *asp1*, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la longitud de las raíces principales, pero sí en la longitud y cantidad de raíces secundarias. Las plántulas tratadas con las cepas ASP1T1 y ASP1T2 exhibieron raíces secundarias más cortas (aproximadamente 65% de reducción) y menos abundantes (43% de reducción) que las plántulas tratadas con la cepa silvestre. A pesar de que las plántulas tratadas con las cepas ASP1Sil1 y ASP1Sil2 también exhibieron una cierta reducción en la longitud de las raíces secundarias (entre el 27% y el 39%) respecto al tratamiento con la cepa silvestre, no se observaron, sin embargo, diferencias significativas a nivel de número de raíces secundarias en comparación con el tratamiento con la cepa silvestre.

Con objeto de confirmar el efecto de las cepas de *T. harzianum* en estudio sobre la arquitectura de la raíz, se analizaron raíces de plántulas de pepino tratadas con germínulas de la cepa fúngica correspondiente en cajas Phitatrax™ con medio líquido PGM (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). A 7 dpi no se observaron diferencias significativas entre el efecto de la cepa silvestre y el control negativo (agua) respecto a la longitud de la raíz principal de las plántulas, así como tampoco se observaron diferencias significativas entre la longitud de las raíces colonizadas por la cepa silvestre y por las cepas ASP1T1, ASP1T2, ASP1Sil1 y ASP1Sil2. Sin embargo, sí se observó que había cambios evidentes en la arquitectura de las raíces secundarias. Las plántulas tratadas con la cepa silvestre exhibieron raíces secundarias con pelos radicales más largos y más abundantes que las plántulas sin tratar (control negativo con agua), si bien no se observaron diferencias significativas entre el efecto de la cepa silvestre y el de las cepas que sobreexpresan o silencian *asp1* (imágenes no mostradas).

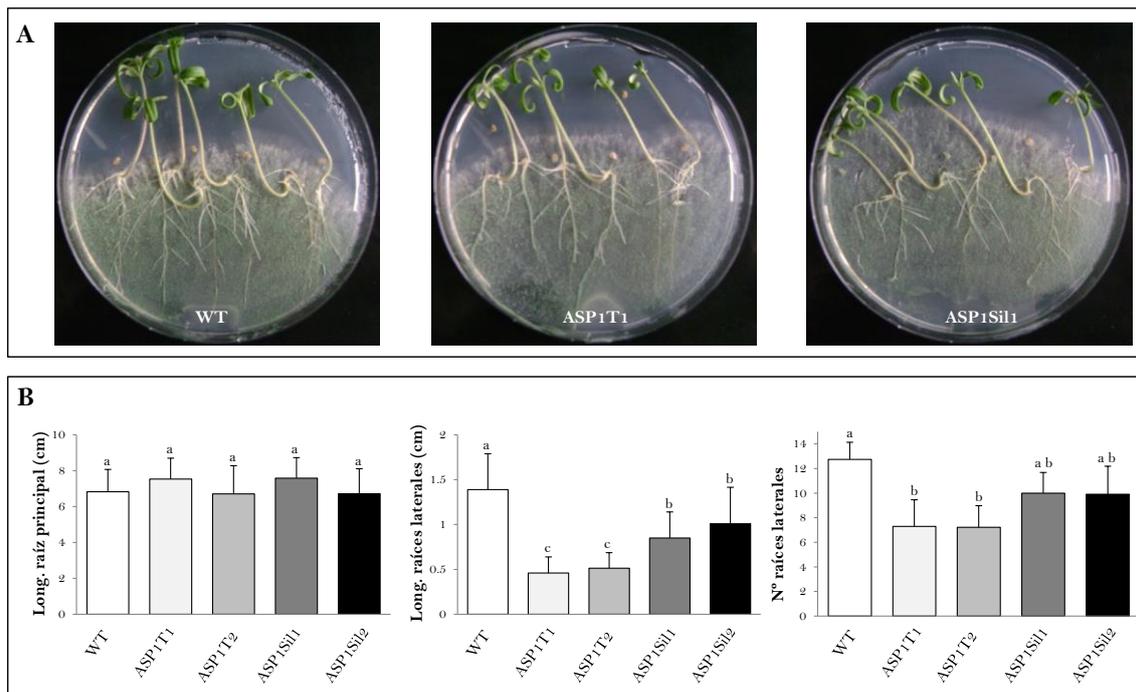


Figura 41. Efecto de *T. harzianum* en la arquitectura de las raíces de plántulas de tomate. WT, cepa silvestre; ASP1T1 y ASP1T2, transformantes que sobreexpresan *asp1*; ASP1Sil1 y ASP1Sil2, transformantes que silencian *asp1*. A: plántulas de tomate cultivadas en medio MS semisólido inoculado con esporas de *T. harzianum* de la cepa correspondiente (según se describe en el apartado 10.5.4 de Materiales y Métodos). B: representación gráfica de la longitud media de las raíces principales, la longitud media de las raíces laterales, y el número de raíces laterales por plántula. Los valores que difieren significativamente están representados por letras diferentes (Test de Duncan; $P=0,05$).

6.4. Inducción de respuestas de defensa en plantas

Con objeto de estudiar si *T. harzianum* CECT 2413 era capaz de provocar la inducción, local o sistémica, de respuestas de defensa en plantas, y si la aspartil-peptidasa ASP1 podía estar implicada en este fenómeno, se llevaron a cabo diferentes ensayos comparando la cepa silvestre y una de las cepas que sobreexpresa *asp1* (ASP1T1).

6.4.1. A nivel local

En primer lugar, se evaluó la capacidad de inducir, a nivel local, respuestas de defensa como la acumulación de fitoalexinas en el tejido vegetal. Para ello, se trataron las hojas cotiledonares de plántulas de pepino con concentrados de proteínas secretadas por la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y por la cepa que sobreexpresa *asp1* (ASP1T1), tras 48 h de crecimiento en medio MM con glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono (en esta condición de cultivo la cepa transformante ASP1T1 secreta

mayoritariamente la proteína ASP1, sin embargo, no hay expresión de la copia endógena del gen *asp1* en ninguna de las cepas). El perfil de proteínas de los concentrados proteicos tanto de la cepa silvestre como de la cepa transformante se mostró en el apartado 1.2 del presente Capítulo (**Figura 27**). Dado que las fitoalexinas generalmente presentan fluorescencia, se evaluó la emisión de fluorescencia a las 24 hpi en el sitio de aplicación del concentrado proteico mediante la exposición a luz UV. Como se muestra en la **Figura 42A**, las hojas tratadas con ácido salicílico (SA) (como control positivo) mostraron fluorescencia en el sitio de aplicación, indicando la acumulación de fitoalexinas. Por el contrario, las hojas tratadas con agua (control negativo) permanecieron intactas. Tanto las hojas cotiledonares tratadas con el concentrado proteico de la cepa silvestre como con el de la cepa ASP1T1 también exhibieron fluorescencia alrededor del sitio de aplicación, si bien la fluorescencia emitida fue más intensa en el caso del tratamiento con el concentrado proteico de la cepa ASP1T1. Cabe destacar que las hojas tratadas con los concentrados proteicos, además de emitir fluorescencia, exhibieron una zona oscurecida justo alrededor del sitio de aplicación, y esta respuesta fue más acusada tras el tratamiento con el concentrado proteico de la cepa ASP1T1. Como se esperaba, los tratamientos con los mismos concentrados proteicos hervidos produjeron respuestas menos intensas que los concentrados sin hervir (**Figura 42A**).

Adicionalmente, se observó que las hojas cotiledonares tratadas con los concentrados proteicos de ambas cepas de *T. harzianum* (WT y ASP1T1) exhibieron lesiones necróticas y cloróticas alrededor del sitio de aplicación, indicando la existencia de una reacción de hipersensibilidad por parte de la planta (**Figura 42B**). Las zonas necróticas observadas coincidieron con las zonas más oscuras detectadas tras la exposición a luz UV. La respuesta observada tras el tratamiento con los mismos concentrados proteicos hervidos fue, de nuevo, menos acusada. La aplicación de SA no generó ningún efecto tóxico aparente en el tejido vegetal.

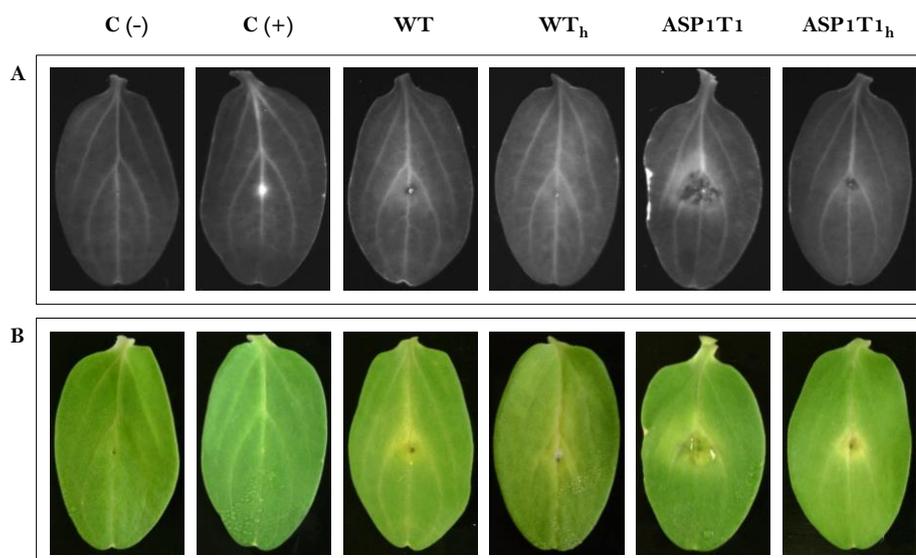


Figura 42. Imágenes representativas de la acumulación de fitoalexinas (A) y fitotoxicidad (B) a nivel local en hojas cotiledonares de plántulas de pepino tras la inoculación con concentrados de proteínas secretadas por cepas de *T. harzianum* (WT, cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413; ASP1T1, transformante que sobreexpresa *asp1*). Los concentrados proteicos se obtuvieron según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos, tras 48 h de crecimiento de *T. harzianum* en presencia de glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono. El perfil de proteínas producidas por las distintas cepas de *T. harzianum* en esta condición de cultivo se muestra en la Figura 27. Las hojas cotiledonares se inocularon con 10 μ L del concentrado proteico (120x) de la cepa correspondiente según se describe en el apartado 10.5.7.1 de Materiales y Métodos. En el caso del concentrado proteico obtenido de la cepa ASP1T1, este volumen contiene 1 nmol de la proteína ASP1, calculado mediante SDS-PAGE. A las 24 horas se evaluó la presencia de fitoalexinas mediante detección bajo luz UV y la aparición de lesiones necróticas. C(-), agua ultrapura estéril; C(+), SA, ácido salicílico (25 nmoles). Los tratamientos con concentrados proteicos hervidos se indican con el subíndice h.

6.4.2. A nivel sistémico

A la vista de que la inoculación de hojas con concentrados de proteínas secretadas por *T. harzianum* CECT 2413 y el transformante ASP1T1 producían lesiones hipersensibles a nivel local y la acumulación de fitoalexinas, el siguiente paso fue evaluar si el tratamiento de plántulas con estos concentrados proteicos llevaba a la inducción de una respuesta de defensa sistémica en partes distales de la planta. Para ello, se trataron las raíces de plántulas de pepino (según se describe en el apartado 10.5.7.2.1 de Materiales y Métodos; ver **Figura 43**) con los mismos concentrados proteicos utilizados en el ensayo anterior, y posteriormente se midió en hojas la expresión de genes marcadores de respuestas de defensa: *PR2* y *PR3*, que codifican para una β -1,3 glucanasa y una quitinasa, respectivamente (forman parte de las llamadas proteínas PR asociadas a la respuesta dependiente de SA); *pal1*, que codifica para una fenil alanina amonio liasa (enzima clave en la ruta biosintética de

fenilpropanoides que conduce a la producción de ciertas fitoalexinas); *hpl*, *lox* y *etr1*, que codifican para una hidroperóxido liasa, una lipoxigenasa y un receptor de ET, respectivamente; y *prx*, que codifica para una peroxidasa (proteínas asociadas a las respuestas dependientes de JA o de ET). Como controles positivos del ensayo se utilizaron plántulas tratadas con SA, y como controles negativos plántulas sin tratar.



Figura 43. Sistema de cultivo de plántulas de pepino utilizado para la inoculación a nivel de la raíz con concentrados de proteínas secretadas por *T. harzianum*.

Como se muestra en la **Figura 44**, el tratamiento de las raíces de las plántulas con el concentrado proteico de la cepa silvestre de *T. harzianum* supuso un aumento significativo de la expresión en hojas de los genes *PR2*, *PR3*, y *pal1* respecto a la expresión basal de estos genes en las plantas sin tratar. Sin embargo, esta respuesta fue mucho menos acusada en el caso del concentrado proteico de la cepa ASPT1 (concentrado proteico hervido o sin hervir). Como cabía esperar, los niveles más altos de expresión de estos tres genes se encontraron en las plántulas tratadas con SA. El nivel de expresión del resto de genes analizados no sufrió cambios significativos tras el tratamiento de las plántulas con los concentrados proteicos de las cepas ensayadas, respecto a las plantas sin tratar (datos no mostrados).

Para comprobar si la respuesta sistémica de defensa observada tras el tratamiento de las plántulas con los concentrados proteicos de *T. harzianum* también tenían lugar *in vivo* durante la interacción *Trichoderma*-planta, se trataron las raíces de las plántulas (según se describe en el apartado 10.5.7.2.2 de Materiales y Métodos) con germínulas de *T. harzianum* (cepas CECT 2413 y ASPT1), y posteriormente se midió en hojas la expresión de los mismos genes marcadores de respuestas de defensa a nivel sistémico analizados en el ensayo anterior. Como controles positivos y negativos del

ensayo se utilizaron plántulas tratadas con SA y plántulas sin tratar, respectivamente.

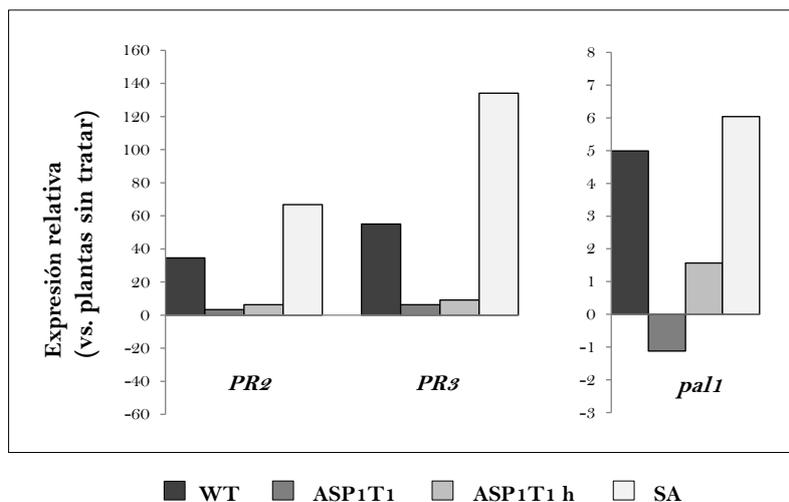


Figura 44. Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de genes marcadores de defensa en hojas cotiledonares de plántulas de pepino tras la inoculación a nivel de raíz con concentrados de proteínas secretadas por cepas de *T. harzianum* (WT, cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413; ASP1T1, transformante que sobreexpresa *asp1*). Los concentrados proteicos se obtuvieron según se describe en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos, tras 48 h de crecimiento de *T. harzianum* en presencia de glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono. El perfil de proteínas producidas por las distintas cepas de *T. harzianum* en esta condición de cultivo se muestra en la Figura 27. Las raíces se trataron con 200 μ L del concentrado proteico (17x) de la cepa correspondiente según se describe en el apartado 10.5.7.2.1 de Materiales y Métodos. En el caso de los concentrados proteicos obtenidos de la cepa ASP1, este volumen contiene 3 nmoles de la proteína ASP1T1, calculado mediante SDS-PAGE. A las 24 horas se recogieron las hojas cotiledonares y se procesaron para su análisis. Se muestra la expresión de los siguientes genes marcadores: *PR2* (β -1,3-glucanasa), *PR3* (quitinasa), *pal1* (fenilalanina amonio liasa). Como gen normalizador se utilizó el gen de la actina de *C. sativus*. Las parejas de oligonucleótidos utilizados se recogen en la Tabla 8. Los valores representados corresponden a la expresión génica relativa a la expresión basal (plántulas tratadas con agua ultrapura estéril en sustitución de los concentrados proteicos). El tratamiento con concentrado proteico hervido se indica con el subíndice h. SA, ácido salicílico (3 nmoles/ μ L).

Como se muestra en la **Figura 45**, el tratamiento de las plántulas con la cepa silvestre de *T. harzianum* resultó en un aumento en la expresión de los genes *PR2*, *PR3* y *pal1*, respecto a las plantas sin tratar, confirmando los resultados obtenidos *in vitro*, con los sobrenadantes proteicos, aunque los niveles de expresión con la cepa silvestre fueron comparables a los obtenidos con la cepa ASP1T1. Los valores más altos de expresión se obtuvieron de nuevo en las plantas tratadas con SA. En este caso tampoco se observaron cambios significativos en el nivel de expresión del resto de genes analizados tras el tratamiento con cualquiera de las cepas de *T. harzianum* ensayadas (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos en estos ensayos indicaban, por tanto, que el tratamiento de plántulas de pepino con *T. harzianum* CECT 2413 inducía una respuesta sistémica de defensa vinculada a la ruta de SA, pero esta respuesta no se veía mejorada por la sobreexpresión de la aspartil-peptidasa ASP1 en esta cepa de *T. harzianum*.

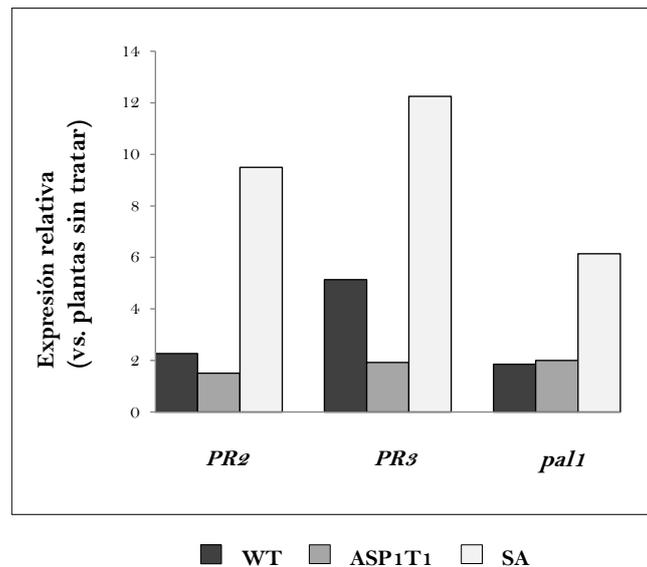


Figura 45. Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de genes marcadores de defensa en hojas cotiledonares de plántulas de pepino tras la inoculación a nivel de raíces con germínulas de *T. harzianum* (WT, cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413; ASP1T1, transformante que sobreexpresa *asp1*). Los ensayos de interacción *Trichoderma*-planta se realizaron con plántulas cultivadas en medio líquido PGM inoculado con germínulas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (según se describe en el apartado 10.5.7.2.2 de Materiales y Métodos). A las 48 hpi se recogieron las hojas cotiledonares y se procesaron para su análisis. Se muestra la expresión de los siguientes genes marcadores: *PR2* (β -1,3-glucanasa), *PR3* (quitinasa), *pal1* (fenilalanina amonio liasa). Como gen normalizador se utilizó el gen de la actina de *C. sativus*. Las parejas de oligonucleótidos utilizados se recogen en la Tabla 8. Los valores representados corresponden a la expresión génica relativa a la expresión basal (plántulas tratadas con agua ultrapura estéril en sustitución de las germínulas). SA, ácido salicílico (3 nmoles/ μ L).

DISCUSIÓN

ASP1 es una hidrolasa perteneciente al grupo de las aspartil-peptidasas o peptidasas ácidas (EC 3.4.23), caracterizadas por la presencia de dos residuos de ácido aspártico en su sitio activo. La subfamilia mejor conocida de este grupo es la A1A, representada por la pepsina A humana, a la que pertenece ASP1 (Suárez y col., 2005). Esta subfamilia agrupa endopeptidasas que actúan en su mayoría a pH ácido, y cuya actividad se inhibe específicamente por la pepstatina A. Nuestros ensayos mostraron que, efectivamente, la máxima actividad de ASP1 ocurre a muy pH ácido (2,0-3,0). Se ha descrito que las aspartil-peptidasas SA76, TaAsp y ASP55 caracterizadas en otras cepas de *Trichoderma* spp., presentan un pH óptimo de actividad de 3,5, 4,0 y 5,5, respectivamente (Liu y Yang, 2007; Yang y col., 2013, Dou y col., 2014), valores en los que la peptidasa ASP1 sufre un drástico descenso en su actividad (50, 75 y 95%, respectivamente). En cuanto al efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad enzimática, se observó que ASP1 permanece estable en un rango de pH más reducido (2,0-6,0) que el de la peptidasa TaAsp (3,0-9,0). A su vez, la máxima actividad de ASP1 se encontró a 50°C, mientras que las peptidasas SA76, TaAsp y ASP55 exhibieron su máxima actividad a 45, 40 y 30°C, respectivamente. Curiosamente, la temperatura en la que se encontró la máxima actividad de ASP1 coincidió con la temperatura de inactivación de la misma. Este fenómeno sugiere un posible efecto protector del sustrato sobre la enzima. La peptidasa ASP1 también se mostró más sensible al efecto de la temperatura que la peptidasa TaAsp, ya que mientras la actividad de ASP1 empieza a perder estabilidad tras su preincubación a 37°C, la actividad de TaAsp se mantiene estable incluso tras su preincubación a 60°C.

Los valores de expresión obtenidos en esta Tesis mediante el análisis de *microarrays* (Capítulo I) corroboraron los resultados obtenidos por Suárez y col. (2007), que demuestran que en la cepa *T. harzianum* CECT 2413 la mayoría de proteasas extracelulares están inducidas por quitina y, por tanto, posiblemente están correguladas con las quitinasas durante la interacción micoparasítica (Steyaert y col., 2004). Adicionalmente, el análisis de expresión llevado a cabo bajo distintas condiciones relacionadas con la interacción *Trichoderma*-planta reveló que a tiempos cortos el gen *asp1* se induce en cultivos de *T. harzianum* en contacto con raíces vegetales (interacción *in vivo*) así como también en presencia de paredes celulares vegetales (interacción simulada), mientras que su expresión era indetectable en presencia de carboximetilcelulosa (pese a que la celulosa es uno de los componentes

mayoritarios de las paredes celulares de las plantas). Estos resultados nos llevan a pensar que las proteínas presentes en las paredes celulares del tejido radical son responsables de inducir la expresión de *asp1*. No obstante, el hecho de que también se detectara una fuerte expresión de *asp1* durante el cultivo de *T. harzianum* en contacto con fibras de nailon, sugiere una respuesta inespecífica asociada al contacto físico del micelio con una superficie sólida. Si tenemos en cuenta que *asp1* se expresa en presencia de raíces, fibras inertes, paredes celulares, tanto fúngicas como vegetales, y quitina –todos ellos componentes que forman suspensiones en el medio de cultivo– y no en presencia de compuestos solubles como la carboximetilcelulosa o de metabolitos secretados por el hongo y por la planta durante su interacción –que contienen proteínas– todo parece apuntar a que su expresión se desencadena cuando el hongo percibe una superficie sólida a la que adherirse. Por otro lado, atendiendo a la débil expresión de *asp1* durante el cultivo de *T. harzianum* en ausencia de fuentes de carbono o nitrógeno en comparación con las proteasas *pra1*, *prb1* y *prb2* (Suárez y col., 2007), se puede deducir que este gen no opera como parte una respuesta general a la privación de nutrientes, sino que más bien parece cumplir una función especializada durante las primeras etapas del proceso micoparasítico. Esto estaría de acuerdo con los resultados de Šimković y col., (2008, 2012), quienes demostraron que la secreción de enzimas proteolíticas por parte de *Trichoderma* spp. no es solamente una respuesta nutricional, sino que su inducción está sujeta a un complejo mecanismo de reconocimiento. El hecho de que los genes *pra1*, *prb1* y *prb2* se induzcan en *T. harzianum* bajo condiciones de micoparasitismo simulado, y que además respondan a una desrepresión catabólica, sugiere que su transcripción está controlada por diferentes sistemas de regulación activados bajo distintas condiciones fisiológicas. La expresión de estos genes en medio mínimo apunta hacia una función estrictamente nutricional cuando *T. harzianum* se comporta como un saprófito y no como un micoparásito. Desde un punto de vista energético, la regulación del gen *asp1* podría interpretarse como un modo de ahorro de energía mientras el hongo rastrea su entorno. De tal modo, su expresión, desencadenada solo tras el contacto del hongo con una superficie que potencialmente podría representar una fuente de nutrientes, –ya sea materia orgánica en descomposición (saprofitismo) u hospedadores fúngicos, vegetales o, incluso, nematodos (biotrofismo)–, reduciría el gasto que supone su transcripción en ausencia de fuentes de carbono o nitrógeno fácilmente asimilables, táctica coherente con la naturaleza oportunista de ciertas especies de *Trichoderma*.

Los resultados obtenidos sobre la regulación del gen *asp1* apoyarían la hipótesis de Suárez y col. (2007) quienes, a partir de la gran diversidad de peptidasas encontradas en *T. harzianum* y de los distintos mecanismos de regulación observados, incluso entre peptidasas pertenecientes a la misma familia, plantearon que esa diversidad se debía más a una especialización funcional que a una redundancia enzimática. Asimismo, recientemente se ha propuesto que el vasto repertorio de peptidasas en el género *Trichoderma* podría constituir un sistema sinérgico para el uso eficiente de proteínas (Druzhinina y col., 2012). De este modo, ciertas especies de *Trichoderma* serían capaces de responder de manera flexible, secretando peptidasas apropiadas según la composición de su entorno, con el fin de aprovechar distintas fuentes proteicas. Esto representaría una ventaja adaptativa en términos de explotación de recursos, especialmente cuando estos son escasos. Se sabe que durante el curso evolutivo, ciertos hongos han ido expandiendo su repertorio de peptidasas, lo que les ha permitido colonizar de modo oportunista diversos nichos ecológicos (St Leger y col., 1997). Así, se ha visto que los genes que codifican para peptidasas se encuentran expandidos en los genomas de *T. atroviride* y *T. virens* –especies micoparasíticas que al igual que *T. harzianum* son utilizadas como ACBs– en comparación con el genoma de la especie saprofita *T. reesei* (Kubicek y col., 2011). De hecho el gen *asp1*, no forma parte del repertorio proteolítico de *T. reesei*.

Con el fin de analizar funcionalmente el gen *asp1*, se obtuvieron cepas transformantes de *T. harzianum* CECT 2413 mediante sobreexpresión y silenciamiento génico. Es importante tener en cuenta ciertos aspectos inherentes al análisis funcional mediante el uso de cepas transformantes. Por un lado, el análisis de cepas silenciadas puede resultar complejo, puesto que normalmente el gen sometido a silenciamiento suele mantener cierto nivel de expresión que podría ser suficiente para el desempeño de su función. Asimismo, el análisis funcional de un gen mediante el uso de cepas silenciadas o mutantes nulos podría verse dificultado por una eventual redundancia funcional o cooperación debida a la acción de otros genes. Por otro lado, se debe considerar que la sobreexpresión de un gen podría enmascarar su efecto real, ya que la sobreproducción de la correspondiente proteína de interés podría generar efectos tóxicos tanto en el organismo que la produce, como en otros organismos con los que este establezca algún tipo de interacción. Además, la sobreexpresión de un gen no conduce necesariamente a un fenotipo distinto, es decir, no siempre implica una ganancia funcional, ya que el nivel de expresión del gen endógeno podría ser suficiente

para la visualización de un fenotipo determinado. En este sentido, el manejo paralelo en este trabajo de transformantes de sobreexpresión y de transformantes silenciados ofrece la oportunidad de explorar la función génica con mayor precisión.

En cuanto a la sobreexpresión del gen *asp1*, el análisis *Southern* permitió determinar que cada una de las cepas transformantes obtenidas presentaba un distinto patrón de integración del casete de expresión del gen. Cabe mencionar que, ni el número de copias completas integradas en el genoma de cada transformante, ni el número de sitios de inserción en el genoma de los mismos, se pudo correlacionar con el nivel de expresión determinado por *Northern*. La falta de correlación entre el número de copias de un gen integradas en el genoma y su expresión, a nivel de ARNm, ha sido descrita previamente para otros genes en *Trichoderma* spp. (Limón y col. 1999; Montero-Barrientos y col., 2007; Morán-Diez y col., 2010), y se le ha atribuido a un efecto posicional, es decir que la particular localización de cada copia génica dentro del genoma incide en su nivel de expresión (Kruszewska, 1999). Por el contrario, la sobreexpresión de *asp1* detectada en las cepas ASP1T1 y ASP1T2 sí guardó relación con la cantidad de proteína producida por cada una de estas cepas. Igualmente, el nivel de proteína ASP1 secretada por cada transformante al medio de cultivo también se correlacionó con la actividad proteolítica total de cada cepa, de modo que la cepa ASP1T1 exhibió aproximadamente el doble de actividad que la cepa ASP1T2.

En cuanto a los dos transformantes silenciados obtenidos en este trabajo, se determinó que estos también tenían un distinto patrón de integración del casete de silenciamiento del gen *asp1*. En este caso sí hubo correlación entre el número de copias del casete integrado en el genoma de cada transformante y el nivel de expresión de *asp1*. De este modo, se encontró que la cepa ASP1Sil2, que integró más copias completas del casete de silenciamiento, a su vez exhibió una cola de degradación del ARNm correspondiente al gen *asp1* más intensa que la cepa ASP1Sil1, resultado que indica un mayor grado de silenciamiento a nivel post-transcripcional. Asimismo, los resultados del análisis *Northern* se correlacionan con los del análisis a nivel de proteína, mostrando que ambos transformantes presentan un alto grado de silenciamiento del gen *asp1* (>95%) y que, efectivamente, la cepa ASP1Sil2 secreta una menor cantidad de la proteína ASP1. De acuerdo con estos datos, se comprobó que la cantidad de proteína ASP1 secretada por cada transformante al medio de cultivo también se correlacionaba con el nivel de actividad proteolítica total, de modo que la cepa ASP1Sil1 exhibió más del doble de actividad que la cepa ASP1Sil2. Por otro lado, considerando que es bien

conocido que en *T. reesei* la ausencia de una proteína en particular se ve compensada mediante la producción de otras proteínas con actividades similares (Suominen y col., 1993), el hecho de que en los perfiles electroforéticos de las proteínas secretadas al medio de cultivo por los transformantes silenciados se hayan observado ciertas bandas más intensas que en el perfil de la cepa silvestre indicaría que la menor secreción de la proteína ASP1 por parte de los transformantes silenciados se ha visto compensada por la secreción de otras peptidasas, que de alguna manera podrían suplir su función.

Sabiendo que la capacidad de las especies de *Trichoderma* para degradar las paredes celulares de organismos fitopatógenos depende de la variedad y cantidad de enzimas líticas que es capaz de secretar (Viterbo y col, 2002b) y que tal secreción depende de la composición de la pared celular del fitopatógeno (Suárez y col., 2005; Qualhato y col., 2013), para evaluar la implicación de ASP1 en el potencial antagonista de *T. harzianum* se llevaron a cabo ensayos frente a hongos fitopatógenos con paredes celulares de distinta naturaleza. Los resultados de los ensayos *in vivo* con la cepa silvestre y los transformantes que sobreexpresan y silencian *asp1*, indicaron que ASP1 podría contribuir al antagonismo que ejerce *T. harzianum* frente al basidiomiceto *R. solani*, pero no al de los ascomicetos *B. cinerea* y *C. acutatum*. La potencial implicación de la aspartil-peptidasa ASP1 en la interacción micoparasítica entre *T. harzianum* y *R. solani* está de acuerdo con los resultados obtenidos por Suárez y col., (2005), quienes analizaron el proteoma de esta cepa y encontraron que tras su crecimiento en presencia de paredes celulares de diferentes fitopatógenos, ASP1 era, no solo la más abundante, sino que el máximo nivel de secreción de la misma ocurría en presencia de paredes celulares de *R. solani*. Adicionalmente, también existe correlación con los resultados de otros estudios proteómicos en los que se encontró secreción diferencial de la proteína ASP1 en la cepa *T. harzianum* ETS 323 tras su cultivo en presencia de paredes celulares de *R. solani*, pero no en presencia de las de *B. cinerea* (Tseng y col., 2008; Yang y col., 2009). Todos estos resultados llevan a pensar que ASP1 cumple una función fundamental durante la interacción *T. harzianum-R. solani*, de modo que la demostrada capacidad de distintas cepas de *T. harzianum* para antagonizar a este fitopatógeno (Elad y col., 1983; Almeida y col., 2007), podría en parte atribuirse a la actividad proteolítica de ASP1. Además de la mayor capacidad para controlar el crecimiento de *R. solani* por parte de los transformantes de *T. harzianum* que sobreexpresan el gen *asp1* en comparación con la cepa silvestre y los transformantes silenciados, el hecho de que, a su vez, estos últimos hayan mostrado un menor

potencial para restringir el crecimiento del patógeno que la cepa silvestre, no solo apoya un papel activo para la aspartil-peptidasa ASP1 durante la interacción micoparasítica *T. harzianum*-*R. solani*, sino que indica que la menor actividad de ASP1 no se ve compensada por la acción de otras proteínas secretadas durante dicha interacción. Estos hallazgos confirman que la gran diversidad de enzimas proteolíticas secretadas por *T. harzianum* efectivamente responde, en cierto grado, a una especialización funcional más que a una redundancia y que, además, el micoparásito requiere de un amplio repertorio de enzimas proteolíticas para poder degradar eficientemente los componentes de las paredes celulares de sus hospedadores con el fin de parasitarlos (Suárez y col., 2007). Esta diversidad funcional también se ha visto en otros grupos de enzimas hidrolíticas fúngicas como es el caso de las quitinasas (Seidl, 2008; Hartl y col., 2012).

Por otro lado, una posible función de ASP1 durante la asociación *Trichoderma*-planta podía consistir en hidrolizar las proteínas antifúngicas secretadas por la planta hospedadora como parte de su respuesta de defensa (Selitrennikoff, 2001), participando así en la protección celular de *T. harzianum*. Sin embargo, si bien se encontró que la sobreexpresión del gen *asp1* mejoraba la protección celular del micelio, teniendo en cuenta que la cepa silvestre mostró el mismo grado de sensibilidad que los transformantes silenciados, su función no parece ser esencial para este fin. Alternativamente, considerando que estos ensayos de resistencia se llevaron a cabo en presencia de glucosa (medio PDB), es posible que el bajo nivel de expresión del gen *asp1* en la cepa silvestre (como consecuencia de la represión catabólica) sea comparable al nivel de expresión residual de los transformantes silenciados, lo que explicaría su mismo comportamiento.

Considerando la potencial implicación de las aspartil-peptidasas en la mediación de la adherencia celular de *Candida albicans* al tejido de su hospedador (Naglik y col., 2003), así como la capacidad de diversas cepas del género *Trichoderma* de penetrar las paredes celulares vegetales y establecer una asociación simbiótica con las mismas (Yedidia y col., 1999), también se consideró una posible participación de ASP1 en el proceso de colonización del tejido radical por parte de *T. harzianum*. Sin embargo, los resultados del ensayo de competencia rizosférica indicaron que un mayor nivel de expresión del gen *asp1* en *T. harzianum* no implica un mayor nivel de colonización interna del tejido radical y, además, que la cepa que presentaba mayor grado de silenciamiento del gen *asp1*, ASPSil2, era la cepa que mostró el mayor nivel de

colonización en etapas avanzadas de este proceso. Estos resultados llevan a pensar que ASP1, en lugar de favorecer la penetración del tejido radical mediante la degradación de las proteínas presentes en la paredes celulares vegetales o mediante la degradación de proteínas de defensa producidas por la planta, podría estar implicada directamente en el diálogo molecular establecido durante su asociación simbiótica, activando transitoriamente el sistema inmune de la planta para limitar la invasión por parte del hongo, al ser reconocida como un MAMP, como una proteína efectora o, alternativamente, mediante la generación de DAMPs. Una función de este tipo no resulta extraña ya que la capacidad de las peptidasas para actuar como PAMPs ha sido ampliamente documentada (Xia, 2004). Incluso se ha demostrado que las propiedades inmunológicas de aspartil-peptidasas fúngicas son independientes de su actividad enzimática (Pietrella y col., 2010) y que aspartil-peptidasas de origen vegetal están implicadas en la regulación de la respuesta HR (Xia y col., 2004) y SAR (Breitenbach y col., 2014), y que es precisamente el SA la fitohormona que limita la colonización de *Trichoderma* al tejido apoplástico de la raíz (Alonso-Ramírez y col., 2014). No obstante, también es posible que la mayor capacidad de la cepa ASP1Sil2 para colonizar el tejido radical refleje cierta redundancia funcional. Es decir, el menor nivel de secreción de ASP1 por la cepa ASP1Sil2 durante la interacción *in vivo* con raíces podría estar compensándose con la secreción de otras proteínas hidrolíticas cuya actividad habría favorecido la colonización del tejido radical. Si bien la actividad aspartil-peptidasa de ASP1 no parece ser compensada por otras peptidasas durante el antagonismo de *R. solani*, puede que ciertas peptidasas sí sean capaces de suplir su función durante la colonización del tejido vegetal, tal y como parece ocurrir con las aspartil-peptidasas potencialmente implicadas en la virulencia del hongo fitopatógeno *B. cinerea*, incluyendo la proteína homóloga de ASP1, BcAP8 (ten Have y col., 2010).

Al evaluar si la cepa silvestre *T. harzianum* CECT 2413 y los transformantes del gen *asp1* tenían algún efecto sobre la arquitectura del sistema radical en plántulas de tomate se encontró que todas las cepas inhibían significativamente la elongación de las raíces principales y secundarias, si bien las cepas que sobreexpresaban *asp1* inhibieron en mayor medida la elongación de las raíces secundarias que la cepa silvestre y que las cepas silenciadas y, además, inhibieron parcialmente su aparición. Esta observación podría ser compatible con el modelo de interacción *Trichoderma*-planta según el cual la defensa dependiente de SA iría acompañada de una disminución de la señalización por auxinas y la consiguiente disminución del número y crecimiento

de raíces secundarias (Shoresh y col., 2010; Hermosa y col., 2012). En este sentido, la potencial activación del sistema inmune de las plantas por parte de ASP1 sería responsable de la inhibición del crecimiento radicular. Alternativamente, ASP1 podría tener un efecto fitotóxico sobre el desarrollo de raíces secundarias. Curiosamente, las cepas silenciadas también mostraron un mayor efecto inhibitorio sobre la elongación de las raíces secundarias que la cepa silvestre. Este resultado lleva a pensar que es posible que bajo estas condiciones las cepas silenciadas también hayan sido capaces de secretar otras proteínas para compensar el menor nivel de ASP1, siendo estas responsables del menor desarrollo de raíces secundarias.

La posible fitotoxicidad de ASP1 se ve apoyada por la acentuada aparición de lesiones necróticas y cloróticas tras la aplicación de concentrados de proteínas secretadas por la cepa que sobreexpresa ASP1, ASP1T1, sobre el tejido foliar y, a su vez, guarda relación con la mayor acumulación de fitoalexinas observada a nivel local respecto a los concentrados proteicos de la cepa silvestre. Las fitoalexinas son compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuya rápida acumulación, junto con la respuesta HR —que implica muerte celular (necrosis) localizada (Mur y col., 2008)—, forma parte de la respuesta temprana de defensa de las plantas (Dodds y Rathjen, 2010). Diversos estudios han demostrado el papel que cumplen las fitoalexinas en la defensa de plantas de pepino frente a organismos fitopatógenos (McNally y col., 2003; Fofana y col., 2005). De hecho, la inducción de resistencia sistémica en plantas de pepino frente a *Pseudomonas syringae* por parte de *T. asperelloides* se correlaciona con la acumulación de fitoalexinas en el tejido vegetal (Yedidia y col., 2003). Asimismo, se ha descrito que una celulasa producida por *T. vires* es capaz de inducir la producción de fitoalexinas y HR (Calderón y col., 1993). En este sentido, el reconocimiento de ASP1 por parte de la planta, o de los compuestos liberados por su actividad proteolítica sobre tejidos vegetales, parece conducir a la activación de su sistema inmune. Según el modelo del zig-zag que ilustra la activación del sistema inmune de las plantas (ver **Figura 3**), la inducción de HR ocurre usualmente tras el reconocimiento de proteínas efectoras (Jones y Dangl, 2006). Esto nos lleva a pensar que ASP1, más que ser reconocida como un MAMP o ser responsable de la producción de DAMPs, podría actuar como un efector.

Por otro lado, la aplicación del sobrenadante de cultivo desactivado por calor de la cepa ASPT1 también desencadenó la aparición de lesiones en el tejido foliar así como la acumulación de fitoalexinas, aunque en menor medida. Estos resultados son

coherentes con que las propiedades inmunológicas de las aspartil-peptidasas sean independientes de su actividad enzimática (Pietrella y col., 2010) y sugieren que la proteína ASP1, independientemente de su actividad proteolítica, puede ser reconocida por la planta como una proteína efectora, si bien por su actividad enzimática también podría generar la producción de DAMPs, incrementando así la amplitud de las defensas de la planta. La capacidad de las especies de *Trichoderma* para inducir la activación de mecanismos de defensa en plantas, independientemente de su actividad enzimática, ha sido ampliamente documentada (Elad, 2000; Martínez y col., 2001; Rotblat y col., 2002; Djonović y col., 2006). No obstante, se debe considerar que el uso de concentrados proteicos de sobrenadantes de cultivo para el análisis funcional de ASP1, en lugar de la proteína purificada, implica la presencia de otras proteínas que podrían enmascarar el efecto real de ASP1 sobre las plantas (aunque los concentrados proteicos se obtuvieron tras el cultivo de las cepas de *Trichoderma* en medio rico, donde la producción de proteínas extracelulares es mucho menor como consecuencia de la represión catabólica). De hecho, en el perfil electroforético de los concentrados proteicos de la cepa silvestre y de las cepas de sobreexpresión se observó una banda intensa de bajo peso molecular (~12,6 kDa) que podría corresponder a la ortóloga de la ceratoplatanina Sm1/Epl1 de *T. virens*/*T. atroviride* (Seidl y col., 2006). En este sentido, la acumulación de fitoalexinas inducida por las proteínas secretadas por la cepa silvestre, así como la fitotoxicidad de las mismas, también podría atribuirse al efecto de Sm1/Epl1 (Djonović y col., 2006). Por otro lado, no se puede descartar que la actividad proteolítica de la proteína ASP1 en las cepas de sobreexpresión haya alterado el contenido proteico de los sobrenadantes por degradación de otras proteínas.

Finalmente, los resultados de los ensayos de inducción de respuestas de defensa en plántulas de pepino indicaron que la cepa *T. harzianum* CECT 2413 es capaz de inducir a nivel sistémico la expresión de los genes *PR2*, *PR3* y *pal1* asociados a la respuesta de defensa dependiente de SA pero no la de genes asociados a la respuesta dependiente de JA/ET, y que la sobreexpresión de ASP1 no contribuye en este efecto, por lo que ASP1 parece estar implicada en la inducción de respuestas de defensa a nivel local, pero no a nivel sistémico. En todo caso, es mucho lo que nos falta por conocer sobre las peptidasas de *Trichoderma*, sobre sus interacciones y sobre su papel en biocontrol y colonización de sustratos, además de su función, como proteínas o como enzimas, en la inducción de respuestas beneficiosas para las plantas.

Conclusiones

1. El *microarray* de alta densidad de oligonucleótidos diseñado en esta Tesis para realizar estudios de expresión génica en especies del género *Trichoderma* (“Trichochip”) ha demostrado ser útil en la detección de genes expresados diferencialmente en *T. harzianum* CECT 2413 cultivado en distintas condiciones de crecimiento. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el potencial de esta herramienta para el análisis de respuestas transcriptómicas en esta y otras especies del género representadas en dicho *microarray*.
2. Los datos globales de expresión generados utilizando el “Trichochip” revelan que el crecimiento de *T. harzianum* CECT 2413 en presencia de glucosa supone mayores cambios en su perfil transcripcional -en comparación con la condición de referencia (medio mínimo)-, que el crecimiento en contacto con raíces de plantas de tomate, y este, a su vez, mayores que el crecimiento en presencia de quitina como única fuente de carbono. Estas respuestas están en consonancia con la disponibilidad de nutrientes en cada una de las tres condiciones.
3. El análisis del perfil transcripcional diferencial de *T. harzianum* CECT 2413 en las primeras horas de contacto con raíces de plantas de tomate ha permitido identificar 47 genes con expresión aumentada en esta condición. Muchos de estos genes están implicados en actividades anabólicas y catabólicas en otros organismos, lo cual refleja un proceso de adaptación del hongo al nicho rizosférico.
4. La expresión del gen *qid74* en las primeras horas de interacción de *T. harzianum* CECT 2413 con plantas de tomate es inducida, probablemente, por la pared celular vegetal.
5. Los ensayos realizados con las cepas QID74T1 y QID74T2 de *T. harzianum*, que sobreexpresan el gen *qid74*, y las cepas QID74Δ1 y QID74Δ2, disruptantes en dicho gen, muestran que la proteína de pared celular QID74 no es determinante del carácter hidrofóbico del micelio de este hongo, ni tampoco de su competencia rizosférica.
6. La capacidad de las cepas QID74T1 y QID74T2 de *T. harzianum*, que sobreexpresan el gen *qid74*, para modificar la arquitectura del sistema radical en plántulas de tomate y pepino, promoviendo la elongación de raíces secundarias

y la proliferación de pelos radicales, respectivamente, explica la mayor captación de nutrientes y el mayor crecimiento de las plantas tratadas con estas cepas en ensayos de invernadero.

7. La expresión del gen *asp1* en las primeras horas de interacción de *T. harzianum* CECT 2413 con plantas de tomate es inducida, probablemente, como consecuencia del reconocimiento por parte del hongo de un sustrato potencialmente colonizable.
8. Los ensayos de enfrentamiento del hongo fitopatógeno *R. solani* con las cepas ASP1T1 y ASP1T2 de *T. harzianum*, que sobreexpresan gen *asp1*, y las cepas ASP1Sil1 y ASP1Sil2, que silencian dicho gen *asp1*, demuestran que la aspartil-peptidasa ASP1 tiene un papel relevante en la respuesta antagonista que *T. harzianum* CECT 2413 despliega frente a este patógeno.
9. La inducción por parte de la proteína ASP1 de respuestas de defensa a nivel local, observadas en hojas cotiledonares de plántulas de pepino, y la mayor capacidad de la cepa ASP1Sil2 de *T. harzianum*, que silencia el gen *asp1*, para colonizar el tejido vegetal sugieren que la proteína ASP1 secretada por *T. harzianum* CECT 2413 provoca en la planta respuestas de defensa dirigidas a limitar la colonización del tejido vegetal por parte del hongo durante el establecimiento de la asociación simbiótica con la planta.
10. La aplicación de germínulas de la cepa *T. harzianum* CECT 2413 en plántulas de pepino, a nivel de la raíz, activa una respuesta de defensa sistémica en las plántulas que se evidencia por la expresión, en hojas cotiledonares, de genes asociados con la ruta de señalización dependiente de SA. La sobreexpresión del gen *asp1* en *T. harzianum* CECT 2413 no altera la inducción de esta respuesta.

Materiales y Métodos

1. MICROORGANISMOS: CEPAS, MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN

1.1. *Escherichia coli*

Para los trabajos de clonación molecular se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (Hanahan, 1983). El mantenimiento de *E. coli* en el laboratorio se realizó mediante resiembras periódicas en placas Petri con medio LB. Los cultivos bacterianos se conservaron a 4°C en placas selladas con Parafilm® durante periodos inferiores a un mes. Para su conservación a largo plazo, se prepararon suspensiones bacterianas en glicerol estéril al 15% (v/v) y se guardaron a -80°C.

1.2. Hongos filamentosos y oomicetos

En las **Tablas 3** y **4** se detallan, respectivamente, las diferentes cepas silvestres y transformantes de *Trichoderma* spp. utilizadas en este trabajo. En la **Tabla 5**, se indican las cepas de hongos y oomicetos fitopatógenos empleadas. El mantenimiento de las cepas en el laboratorio se realizó mediante resiembras periódicas en placas Petri con medio PDA, depositando en el centro de la placa un cilindro de agar procedente de cultivos anteriores. Los cultivos se conservaron a 4°C en placas selladas con Parafilm® durante periodos inferiores a un mes. Para su conservación a largo plazo, se prepararon suspensiones de esporas (recogidas como se describe en el apartado 4.1) en glicerol estéril al 15% (v/v) y se guardaron a -80°C. En el caso de *P. ultimum* y *R. solani*, la conservación a largo plazo se realizó guardando cilindros de agar con micelio en agua destilada estéril a temperatura ambiente.

Tabla 3. Cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en este trabajo.

ESPECIE	CEPA*	NOMBRE	ORIGEN	FUENTE
<i>T. aggressivum</i>	CBS 100525	TH2	Reino Unido	Abono de champiñón
<i>T. asperellum</i>	IMI 20268	T53	España	Suelo
<i>T. atroviride</i>	ATCC 74058	TP1	EE.UU	Virutas de madera
<i>T. atroviride</i>	IMI 352941	T11	Francia	Suelo
<i>T. harzianum</i>	ATCC 20847	T22	EE.UU	Fusión de protoplastos
<i>T. harzianum</i>	CECT 2413	T34	EE.UU	Suelo
<i>T. harzianum</i>	ATCC 204438	T3K	Suecia	Musgo de turbera
<i>T. harzianum</i>	UNINA 96	TA6	Italia	-
<i>T. longibrachiatum</i>	NBT 52	T52	Eslovaquia	Planta de tratamiento de agua
<i>T. reesei</i>	ATCC 13631	QM6a	Islas Solomón	Lona de algodón
<i>T. stromaticum</i>	CBS 101875	TST	Brasil	Retamas muertas de cacao
<i>T. virens</i>	NBT 59	T59	España	Suelo tratado con quitosano
<i>T. viride</i>	NBT 78	T78	España	Cáscara de naranja

* CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia, España.; NBT, NewBiotechnic S.A., Sevilla, España; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Países Bajos; IMI, International Mycological Institute, CABI Bioscience, Egham, Reino Unido; UNINA, Universidad Federico II de Nápoles, Portici, Italia.

Tabla 4. Cepas transformantes y disruptantes de *T. harzianum* CECT 2413.

CEPA	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA
ASP1T1	Expresión constitutiva del gen <i>asp1</i>	Este trabajo
ASP1T2	Expresión constitutiva del gen <i>asp1</i>	Este trabajo
ASP1Sil1	Silenciamiento del gen <i>asp1</i>	Este trabajo
ASP1Sil2	Silenciamiento del gen <i>asp1</i>	Este trabajo
QID74T1	Expresión constitutiva del gen <i>qid74</i>	Rosado y col. (2007)
QID74T2	Expresión constitutiva del gen <i>qid74</i>	Rosado y col. (2007)
QID74Δ1	Delección del gen <i>qid74</i>	Rosado y col. (2007)
QID74Δ2	Delección del gen <i>qid74</i>	Rosado y col. (2007)
GFP/WT	Expresión constitutiva del gen <i>gfp</i>	Este trabajo
GFP/QID74Ta	Expresión constitutiva del gen <i>gfp</i> Derivada de QID74T2	Este trabajo
GFP/QID74Tb	Expresión constitutiva del gen <i>gfp</i> Derivada de QID74T2	Este trabajo
GFP/QID74Δa	Expresión constitutiva del gen <i>gfp</i> Derivada de QID74Δ2	Este trabajo
GFP/QID74Δb	Expresión constitutiva del gen <i>gfp</i> Derivada de QID74Δ2	Este trabajo

* Las cepas QID74T1, QID74T2, QID74Δ1 y QID74Δ2 fueron proporcionadas por el grupo de la Dra. Tahía Benítez (Universidad de Sevilla).

Tabla 5. Cepas de hongos/oomicetos fitopatógenos utilizadas en este trabajo.

ESPECIE	CEPA*	ORIGEN	FUENTE
<i>Botrytis cinerea</i>	B05.10	Alemania	Derivada de la estirpe SAS56
<i>Colletotrichum acutatum</i>	IMI 364856	España	Plantas de fresa
<i>Pythium ultimum</i>	UNINA 8	Italia	Plantas de tomate
<i>Rhizoctonia solani</i>	UNINA 19	Italia	Plantas de tomate

* La cepa de *B. cinerea* fue proporcionada por el Dr. Ernesto Pérez Benito (Universidad de Salamanca). Las cepas de *P. ultimum* y *R. solani* fueron proporcionadas por el Dr. Matteo Lorito (Universidad Federico II de Nápoles).

2. PLANTAS: VARIEDADES Y CONDICIONES GENERALES DE CRECIMIENTO

La variedad y procedencia de las plantas de tomate y de pepino utilizadas en este trabajo se recogen en la **Tabla 6**. La germinación de semillas y el crecimiento de las plantas se llevaron a cabo en cámara de cultivo (fitotrón) o en invernadero, en ambos casos bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad (22-25°C, fotoperiodo de 16 h de luz y 75% de humedad relativa).

Tabla 6. Variedades de plantas de tomate y pepino utilizadas en este trabajo.

ESPECIE	VARIEDAD	PROCEDENCIA
Tomate		
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Manitú híbrido	Ramiro Arnedo S.A. (Calahorra, La Rioja, España)
	Marmande tipo Raf	Semillas Batlle S.A. (Molins de Rei, Barcelona, España)
Pepino		
<i>Cucumis sativus</i> L.	Kfir	Gedera Seeds Co. (Gedera, Israel)
	Marketmore 70	Semillas Batlle S.A. (Molins de Rei, Barcelona, España)

3. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo utilizados se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1 atm de presión durante 20 min. Los medios sólidos para bacterias y hongos se prepararon con agar bacteriológico europeo (fuerza: 850 g/cm²), y los medios semisólidos para plantas con agar bacteriológico americano (fuerza: 680 g/cm²), ambos de Pronadisa.

3.1. Medios de cultivo para bacterias

Medio LB (Luria-Bertani): NaCl 10 g, bacto triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, agua destilada c.s.p. 1 L. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 1 M. Agar 15 g (para LB sólido). Se utilizó como medio de rutina para el crecimiento de *E. coli* DH5 α . Cuando fue necesario se adicionó ampicilina (100 μ g/mL).

Medio SOC: Bacto triptona 20 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 0,5 g, KCl 0,19 g, agua destilada c.s.p. 1 L. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH, autoclavar y añadir 5 mL de una solución 2 M de MgCl₂·6H₂O autoclavada y 20 mL de una solución 1 M de glucosa filtrada a esterilidad. Este medio se empleó para la preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α .

3.2. Medios de cultivo para hongos

Medio Agar-Agua: Agar 25 g, agua destilada c.s.p. 1 L. Este medio se utilizó para la obtención de cultivos monospóricos de los transformantes de *T. harzianum*.

Medio completo CM: Extracto de malta 5 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 5 g, agua destilada c.s.p. 1 L. Se utilizó como medio líquido de crecimiento de *T. harzianum* para la posterior obtención de protoplastos.

Medio sintético SM (Okon y col., 1973): Glucosa 15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, K_2HPO_4 0,6 g, KCl 0,15 g, NH_4NO_3 1 g, metales traza* 1 mL, agua destilada c.s.p. 1 L. Este medio se utilizó para obtener germínulas de *T. harzianum*.

* **Metales traza:** $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4 mg, CoCl_2 2 mg, agua destilada c.s.p. 1 L. Esterilizar en autoclave.

Medio PDA (*Potato Dextrose Agar*): Preparado de Sigma 39 g, agua destilada c.s.p. 1 L. Se utilizó como medio sólido de rutina para el crecimiento de hongos.

Medio PDA-tomate: Preparado de Sigma 39 g, hojas frescas de tomate licuadas al 25% (p/v), agua destilada c.s.p. 1 L. Se utilizó como medio sólido para el crecimiento y obtención de esporas de *B. cinerea*.

Medio PDB (*Potato Dextrose Broth*): Preparado de Difco 24 g, agua destilada c.s.p. 1 L. Se utilizó como medio líquido de rutina para el crecimiento de hongos.

Medio TSA-Sac (*Triptic Soy Agar-Sacarosa*): Preparado TSB (*Triptic Soy Broth*) de Merck 30 g, sacarosa 103 g, agar técnico Difco 15 g. Este medio se utilizó para la regeneración de protoplastos de *T. harzianum*. Cuando fue necesario se adicionó higromicina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o fleomicina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para la selección de transformantes.

Medio MM basal (Penttilä y col., 1987): KH_2PO_4 15 g, metales traza* 1 mL, agua destilada c.s.p. 973,5 mL. Ajustar el pH a 5,5 con KOH 1M. Una vez esterilizado en autoclave añadir: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (250 mg/mL) 20 mL (esterilizado en autoclave), CaCl_2 (1M) 4,1 mL (esterilizado por filtración), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1M) 2,4 mL (esterilizado en autoclave). Se utilizó como medio líquido para el crecimiento de *Trichoderma* spp.

* **Metales traza:** $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,6 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g, agua destilada c.s.p. 1 L. Esterilizar en autoclave.

3.3. Medios de cultivo para plantas

Medio MS basal (Murashige y Skoog, 1962): Sales MS* 4,9 g, agua destilada c.s.p. 1 L. Ajustar el pH a 5,7 con KOH 1M. Se utilizó en los ensayos de interacción *Trichoderma*-tomate realizados en medio líquido. Para los ensayos en medio semisólido se añadieron 10 g de sacarosa como fuente de carbono y 8 g de agar americano por litro de medio.

* **Sales MS** (Duchefa): Este preparado es una combinación de sales inorgánicas (micro y macronutrientes), vitaminas y tampón MES como estabilizador de pH. Su composición en 1 L de medio es la siguiente: Microelementos, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg, FeNaEDTA 36,70 mg, H_3BO_3 6,2 mg, KI 0,83 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16,90 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,60 mg; Macroelementos, CaCl_2 332,02 mg, KH_2PO_4 170 mg, KNO_3 1900 mg, MgSO_4 180,54 mg, $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 1650 mg; Vitaminas, glicina 2 mg, mio-Inositol 100 mg, ácido nicotínico 0,5 mg, piridoxina-HCl 0,5 mg, tiamina-HCl 0,1 mg; Tampón, MES 500 mg.

Medio PGM (*Plant growth medium*) (Yedidia y col., 1999): MgSO_4 0,24 g, K_2HPO_4 0,04 g, K_2SO_4 0,17 g, $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,344 g, NH_4NO_3 0,64 g, metales traza* 1 mL, agua destilada c.s.p. 1 L. Ajustar el pH a 5,5 con KOH 1M. Este medio se utilizó para el cultivo de plantas de pepino en medio líquido.

* **Metales traza:** FeCl_3 50 mg, KCl 728 mg, H_3BO_3 1.546 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 846 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 375 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 125 mg, H_2MoO_4 81 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, agua destilada c.s.p. 1 L. Esterilizar en autoclave.

4. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS

4.1. Obtención de esporas fúngicas

Para la obtención de esporas de *T. harzianum* se inocularon placas Petri con medio PDA depositando en el centro de las mismas un cilindro de agar procedente de un cultivo anterior. Las placas se incubaron a 28°C durante aproximadamente 5-7 días para permitir la esporulación del hongo. Posteriormente, se añadieron 5 mL de agua destilada estéril y se procedió a raspar la superficie de la placa con la punta de una micropipeta. Los restos de micelio se eliminaron por filtración a través de lana de vidrio en un tubo de microcentrífuga con el fondo agujereado. Alternativamente, las suspensiones de esporas se obtuvieron por agitación de la placa en presencia de 5 mL de agua destilada estéril y microesferas de vidrio estériles (3 mm de diámetro). Las esporas se almacenaron a 4°C hasta su uso durante un periodo máximo de 7 días. El recuento de esporas se realizó en cámara Thoma a partir de una dilución 1:100 de la suspensión original.

En el caso de *B. cinerea* el proceso de recogida de esporas fue similar al descrito anteriormente con la excepción de que el hongo se cultivó en medio PDA-tomate y las esporas se recogieron en una solución estéril de Tween® 20 al 0,005% (v/v) con la ayuda de un asa de Digralsky. A continuación, se filtraron normalmente a través de lana de vidrio. Finalmente, se centrifugaron a 200 g durante 10 min y otras dos veces más a 100 g durante 10 min para la eliminación de microconidios.

4.2. Cultivos monospóricos de *T. harzianum*

A partir de un cultivo de *T. harzianum* crecido y esporulado en placas Petri con medio PDA, se recogió una pequeña cantidad de esporas con un asa de siembra, se resuspendió en 500 µL de una solución estéril de Tween® 20 al 0,2% (v/v) y se agitó con ayuda de un vortex. Posteriormente, con el fin de obtener esporas aisladas, estas se sembraron en estría en placas con medio Agar-Agua según se muestra en la **Figura 46**. Las placas se incubaron durante aproximadamente 8 h a 25°C, tiempo suficiente para que las esporas empiecen a germinar. A continuación, con ayuda de un estereomicroscopio (50x) se localizaron esporas aisladas, se recogieron con una aguja estéril y se sembraron en placas con medio PDA.

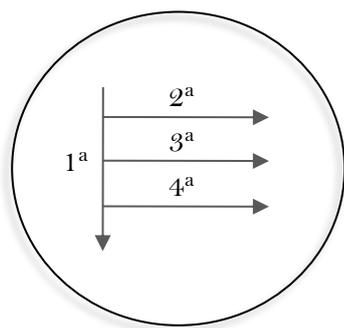


Figura 46. Esquema representativo de la siembra en estría de esporas de *T. harzianum* para la obtención de cultivos monospóricos.

4.3. Obtención de germínulas de *T. harzianum*

Para la obtención de germínulas de *T. harzianum* (esporas que solo han formado el tubo germinativo), se inocularon 50 mL de medio SM con esporas (obtenidas según se describió en el apartado 4.1) a una concentración final de 1×10^7 esporas/mL en matraces de 250 mL. Para permitir la germinación de las esporas los matraces se incubaron a 28°C durante 15 h en agitación (150 rpm). Las germínulas se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación a 10.000 g durante 5 min y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Se prepararon suspensiones de $2,5 \times 10^7$ germínulas/mL en agua destilada estéril, que se utilizaron inmediatamente para los ensayos correspondientes.

4.4. Cultivos de *T. harzianum* para la extracción de ADN

Se inocularon 100 mL de medio PDB con esporas de *T. harzianum* (obtenidas según se describió en el apartado 4.1) a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL en matraces de 250 mL, y se incubaron a 28°C durante 48 h en agitación (150 rpm). Transcurrido este tiempo, se recogió la biomasa obtenida mediante filtración a vacío a través de discos de papel de filtro y se lavó el micelio dos veces con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio de cultivo. Se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante aproximadamente 12 h en un liofilizador Virtis® Advantage (SP Scientific). La pastilla de micelio obtenida se conservó a -20°C hasta su utilización.

4.5. Cultivos de *T. harzianum* para la extracción de ARN

Estos cultivos se realizaron en dos etapas. En la primera etapa (producción de biomasa) se inocularon 100 mL de medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v) con esporas de *T. harzianum* (obtenidas según se describió en el apartado 4.1) a una concentración final de 1×10^5 esporas/mL en matraces de 250 mL. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 48 h en agitación (150 rpm). Transcurrido este tiempo, el micelio se filtró a vacío a través de papel de filtro en condiciones de esterilidad y se lavó dos veces con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio de cultivo. En la segunda etapa, la pastilla de micelio obtenida se transfirió a los medios de cultivo definitivos. Estos cultivos se realizaron en medio líquido MM, MS o PGM, bien en su forma basal o suplementados con la fuente de carbono deseada. Los cultivos definitivos se incubaron en las mismas condiciones que los precultivos durante un tiempo variable, entre 4 y 48 h. Finalmente, el micelio se recogió mediante filtración y se lavó dos veces con agua destilada estéril. Inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante aproximadamente 12 h en un liofilizador Virtis® Advantage (SP Scientific). La pastilla de micelio obtenida se conservó a -20°C hasta su utilización.

4.6. Cultivos de *T. harzianum* para la obtención de proteínas extracelulares

Los cultivos de *T. harzianum* para la obtención de proteínas extracelulares se realizaron en dos etapas tal y como se indicó en el apartado anterior, pero en este caso se recogió el sobrenadante después de haber retirado el micelio por filtración. Los sobrenadantes se mantuvieron a -20°C hasta su utilización para la precipitación y diálisis de proteínas (apartado 8.1).

4.7. Obtención de paredes celulares fúngicas

La obtención de paredes celulares fúngicas se llevó a cabo a partir de micelio crecido en medio líquido PDB durante aproximadamente 7 días, tomando como referencia el método descrito por Fleet y Phaff (1974):

1. Autoclavar el medio de cultivo con el micelio y centrifugarlo a 12.000 g durante 10 min. Eliminar el sobrenadante.
2. Lavar el precipitado dos veces con agua destilada y recoger la biomasa centrifugando en las mismas condiciones. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender la biomasa en NaCl al 2% (p/v) y centrifugar en las mismas condiciones que el paso anterior. Eliminar el sobrenadante.
4. Lavar el precipitado dos veces más con NaCl al 2% (p/v) y otras dos veces con agua destilada centrifugando cada vez.
5. Secar el precipitado prensándolo entre papeles de filtro.
6. Congelar y liofilizar.
7. Pulverizar en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. Mantener a temperatura ambiente hasta su utilización.

5. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE PLANTAS

5.1. Esterilización superficial de semillas

Las semillas se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% (v/v) mediante agitación en *vortex* durante 10 min en el caso de tomate o durante 2 min en el caso de pepino. En ambos casos el proceso se repitió utilizando una solución de lejía al 50% (v/v). Finalmente, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se retiró el exceso de humedad colocándolas entre papeles de filtro esterilizados.

5.2. Cultivo de plantas en turba

Las semillas esterilizadas superficialmente o pildoradas (apartado 10.5.1) se sembraron en bandejas con alvéolos conteniendo una mezcla de turba estéril* y vermiculita (3:1), y se incubaron en fitotrón o en invernadero bajo condiciones controladas de crecimiento ($22-25^{\circ}\text{C}$, 16 h de luz y 75% de humedad relativa). Las plantas se regaron diariamente con agua y en algunos ensayos se regó semanalmente con solución nutritiva Hoagland** para asegurar la disponibilidad de nutrientes.

* **Esterilización de turba:** La turba se esterilizó tres veces consecutivas en autoclave a 120°C y 1 atm de presión durante 1 h dentro de bolsas de plástico. Entre cada autoclavado, la turba se mantuvo dentro de la bolsa durante 24 h a temperatura ambiente y se removió vigorosamente antes de la siguiente ronda de esterilización.

** **Solución Hoagland** (Hoagland y Arnon, 1950): Esta solución nutritiva es una combinación de sales inorgánicas. Se preparan las siguientes soluciones *stock* de

macronutrientes por separado: KNO_3 101,1 g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 236,16 g/L, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 115,08 g/L y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246,49 g/L; una solución *stock* de micronutrientes compuesta por: KCl 1,846 g/L, H_3BO_3 0,773 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,169 g/L, ZnSO_4 0,288 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,062 g/L y H_2MoO_4 0,04 g/L; una solución *stock* Fe-EDTA compuesta por: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,484 g/L y EDTA 1,5 g/L. Al momento de usar se mezclan las siguientes cantidades de soluciones *stock* autoclavadas para 1 L de solución de trabajo: KNO_3 6 mL, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4 mL, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16,90 mL, solución de micronutrientes 2 mL y Fe-EDTA, 1 mL. Tanto las soluciones *stock* como las soluciones de trabajo se preparan con agua destilada.

5.3. Cultivo de plantas de tomate en medio semisólido MS

Las semillas de tomate esterilizadas superficialmente se sembraron en medio MS 0,2x semisólido en placas Petri de 14 cm de diámetro. En cada placa se depositaron un máximo de 6 semillas (**Figura 47A**). Con el fin de permitir el crecimiento de las raíces en el agar y evitar el crecimiento aéreo de los hipocótilos las placas (selladas con cinta quirúrgica) se incubaron verticalmente en un ángulo de 90° .

Las semillas de tomate pildoradas (apartado 10.5.1) se sembraron en medio MS 0,2x semisólido (50 mL) en cajas autoclavables (Magenta® GA-7, Sigma) (**Figura 47B**). En cada caja se depositaron un máximo de 16 semillas. Las placas y las cajas se incubaron en fitotrón bajo condiciones controladas de crecimiento (23°C , 16 h de luz y 75% de humedad relativa).

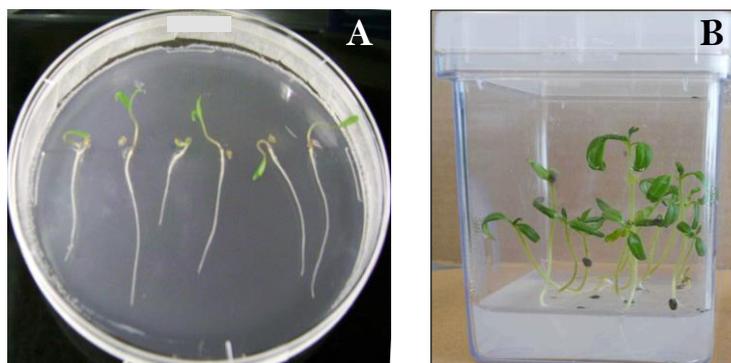


Figura 47. Sistemas de cultivo de plántulas de tomate en medio semisólido (MS 0,2x). A: Germinación de semillas en placas Petri de 14 cm de diámetro. B: Germinación de semillas en cajas Magenta® GA-7 (Sigma).

5.4. Cultivo de plantas de pepino en medio líquido PGM: cultivos hidropónicos

Los cultivos hidropónicos se realizaron tomando como referencia el sistema de crecimiento descrito por Yedidia y col. (1999). Para ello, se utilizaron cajas Phytatray™ II (Sigma) o alternativamente cajas Magenta® GA-7 (Sigma), conteniendo 100 mL de medio PGM. Dentro de cada caja se depositaron un máximo de 20 semillas de pepino, esterilizadas superficialmente, sobre una rejilla metálica cubierta con gasa estéril a modo de soporte, de tal manera que quedaran a una distancia de 1,5 cm desde la superficie del medio (**Figura 48**). Las cajas se incubaron en agitación suave dentro de un fitotrón bajo condiciones controladas de crecimiento (25°C , 16 h de luz y 75 % de humedad relativa).

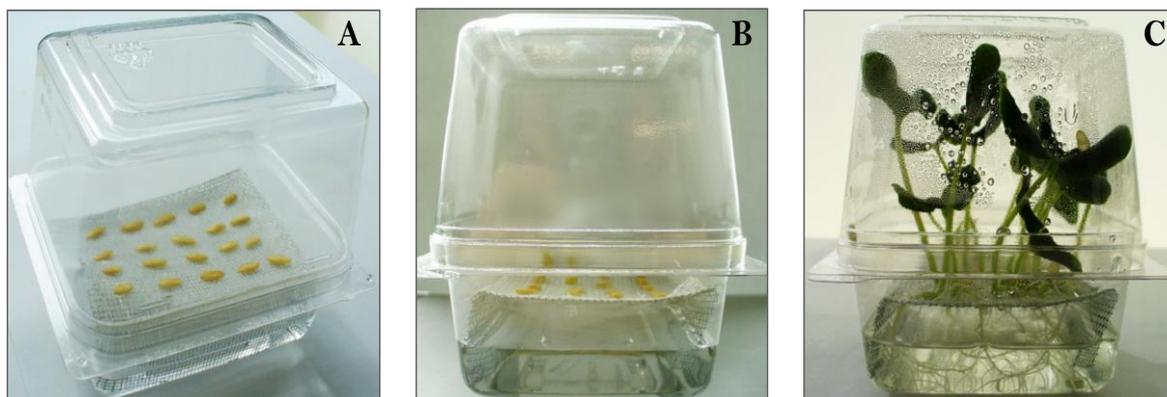


Figura 48. Sistema hidropónico de crecimiento de plántulas en cajas Phytatray™ II (Sigma). A y B: Semillas de pepino recién colocadas sobre una rejilla metálica cubierta con gasa estéril a 1,5 cm de la superficie del medio (100 mL de medio PGM). C: Plántulas de pepino después de 7 días de crecimiento en fitotrón en condiciones controladas (25°C, 16 h de luz y 75% de humedad relativa).

5.5. Obtención de paredes celulares vegetales

La obtención de paredes celulares vegetales se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de paredes celulares fúngicas (apartado 4.7), partiendo en este caso de raíces pulverizadas de plantas de pepino o tomate en lugar de micelio autoclavado.

6. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1. Vectores de clonación

Las características más relevantes de los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo se recogen en la **Tabla 7** y se muestran en la **Figura 49**.

6.2. Oligonucleótidos

La secuencia y características de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la **Tabla 8**. Todos fueron sintetizados por las casas comerciales Isogen Life Science, Thermo Fisher Scientific o Sigma.

Tabla 7. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	UTILIDAD	REFERENCIA
pAN52-1 5.721 pb	Derivado del vector pUC18, incluye el promotor del gen <i>gpdA</i> (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y el terminador del gen <i>trpC</i> (polipéptido trifuncional que cataliza tres pasos de la biosíntesis de triptófano a partir de corismato), ambos de <i>Aspergillus nidulans</i>	Clonación del gen <i>asp1</i>	Punt y col. (1987)
pAN7-1 6.756 pb	Derivado de pAN52-1 tras la inserción del gen <i>hph</i> (higromicina B fosfotransferasa) de <i>E. coli</i> , que confiere resistencia a higromicina en hongos filamentosos	Cotransformación de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 como plásmido portador del gen marcador de selección	Punt y col. (1987)
pGEM®-T Easy 3.015 pb	Presenta un sitio de clonación múltiple dentro de la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i> (<i>lacZ</i>), lo que permite la identificación de clones recombinantes por color	Clonación de productos de PCR generados por polimerasas que añaden adenosinas en los extremos 3' del ADN que sintetizan. Se utilizó en pasos intermedios del proceso de obtención de las construcciones para la transformación de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	Promega
pJL43b1 4.488 pb	Incluye un casete de expresión del gen <i>ble</i> de <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> , que confiere resistencia a fleomicina, bajo el control del promotor del gen <i>gpdA</i> (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y el terminador del gen <i>cyc1</i> (citocromo oxidasa 1) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Preparación de la construcción para la expresión constitutiva del gen <i>asp1</i> en <i>T. harzianum</i> CECT 2413	Gutiérrez y col. (1997)
pSIL 5.280 pb	Construido mediante la clonación sucesiva de diferentes fragmentos en el vector pBluescript® SK(+) (Stratagene). Incluye el promotor del gen <i>ta</i> de <i>T. harzianum</i> CECT 2413, un fragmento de 159 pb de uno de los intrones de la secuencia genómica de la misma cepa y el terminador del gen <i>cbh2</i> (celobiohidrolasa 2) de <i>T. reesei</i>	Preparación de la construcción para el silenciamiento de la expresión del gen <i>asp1</i> en <i>T. harzianum</i> CECT 2413	Sousa (2004)
pZEGA 1 5.221 pb	Derivado de pRLM _{ex30} (Mach y col., 1994), presenta una versión sintética del gen <i>gfp</i> (<i>green fluorescent protein</i>) de <i>Aequorea victoria</i> bajo el dominio del promotor del gen <i>pki1</i> (piruvato quinasa 1) y el terminador del gen <i>cbh2</i> (celobiohidrolasa 2) de <i>T. reesei</i>	Obtención de cepas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 que expresan el gen reportero <i>gfp</i>	Zeilinger y col. (1999)

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3') *	UTILIDAD	SITIO DE UNIÓN
T3	ATTAACCTCACTAAAGGGA	Secuenciación y amplificación de insertos por PCR en Uni-Zap XR	PT3
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGG	Secuenciación y amplificación de insertos por PCR en Uni-Zap XR y PGEM-T	PT7
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC	Secuenciación y amplificación de insertos en PGEM-T	PSP6
6281Nf	TATATACCATGGTTATGCTCTCTCTCTATTG <i>NcoI</i>	Clonación de la ORF de <i>asp1</i> en PAN52-1	<i>asp1</i> (extremo 5')
6281Nr	TATATACCATGGTTAAGCGGCGGTAGCAAAGC <i>NcoI</i>	Clonación de la ORF de <i>asp1</i> en PAN52-1	<i>asp1</i> (extremo 3')
6281Fv	CTCTCTCTCTATTGCCATT	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>asp1</i> (extremo 5')
6281Rv	TTAAGCGGCGGTAGCAAAGC	Comprobación de las construcciones y transformantes / Obtención de sondas para análisis tipo <i>Northern</i>	<i>asp1</i> (extremo 3')
pAN52-gpdH-5'	TATATAAAGCTTCCTTGTATCTCTACAC <i>HindIII</i>	Subclonación de <i>PgpdA:asp1</i> en pJL43b1 / Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>PgpdA</i> (extremo 5')
pAN52-trpH-3'	TATATAAAGCTTGGAGATGTGGAGTGGG <i>HindIII</i>	Subclonación de <i>PgpdA:asp1</i> en pJL43b1 / Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>TrpC</i> (extremo 3')
pSIL6281-I	CGCTCGAG TCTAGATGGGACCTCATCGTCGAC <i>XhoI XbaI</i>	Clonación de un fragmento de <i>asp1</i> en pSIL	<i>asp1</i> (interno)
pSIL6281-IR	CGGAATTC GGATCCCAACTCGCCGTTGGTGTC <i>EcoRI BamHI</i>	Clonación de un fragmento de <i>asp1</i> en pSIL	<i>asp1</i> (interno)
pSIL6281-f1	TAAATCCTGGGACCTCATCGTCGAC	Obtención de sondas para análisis tipo <i>Southern</i> y <i>Northern</i>	<i>asp1</i> (interno)
pSIL6281-r1	CGGGATCCCAACTCGCCGTTGG <i>BamHI</i>	Obtención de sondas para análisis tipo <i>Southern</i> y <i>Northern</i>	<i>asp1</i> (interno)
pSIL6281-f2	TATAGCCTCGAGGACCTCATCGTCGAC <i>XhoI</i>	Clonación de un fragmento de <i>asp1</i> en pSIL	<i>asp1</i> (interno)
pSIL6281-r2	CGGAATTCCAACTCGCCGTTGGT <i>EcoRI</i>	Clonación de un fragmento de <i>asp1</i> en pSIL	<i>asp1</i> (interno)
gpd5SacF	GAGCTCTGTACAGTGACCGGT <i>SacI</i>	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>PgpdA</i> (interno)
gpdIF	GCCCATCCGGCATCTGTAGG	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>PgpdA</i> (interno)
gpd3F	ATCTTCAGTATATTCATCTCCCATC	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>PgpdA</i> (extremo 3')
2088I	ACATCCCACCAAGGCTTAC	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>asp1</i> (interno)

* La secuencia correspondiente al sitio de restricción se encuentra subrayada.

Tabla 8. Continuación.

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	UTILIDAD	SITIO DE UNIÓN
2088IR	GATGGAACCTTGCTGTAGAG	Comprobación de las construcciones y transformantes / Obtención de sondas para análisis tipo <i>Northern</i>	<i>asp1</i> (interno)
2088IR2a	GATCTTGTGATGCGTGCCTG	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>asp1</i> (interno)
Int F	GTGCTAATCGTGTATGCACAG	Comprobación de las construcciones y transformantes	Intrón de pSIL
Int R	CTGTGCATAACACGATTAGCAC	Comprobación de las construcciones y transformantes	Intrón de pSIL
psil-Prom	GATGCACTGCAGTCCACATTG	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>Pta</i> (extremo 3')
psil-Ter	GAGCTCAACCCAAAGGAGGG	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>Tcbh2</i> (interno)
psil-Term 1	GTTGCTCATTGCGGTCTACC	Comprobación de las construcciones y transformantes / Obtención de sondas para análisis tipo <i>Southern</i>	<i>Tcbh2</i> (extremo 5')
TADIR2	TGACCACTTCGCTGCCTATC	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>Pta</i> (extremo 5')
TADIR3	GATGTCAAGGGCGCAACTAGA	Comprobación de las construcciones y transformantes	<i>Pta</i> (interno)
FUP	GTTGTAACACGACGGCCAGT	Comprobación de las construcciones y transformantes	pSIL y pZEGA 1 (de pUC19)
RUP	AGGAAACAGCTATGACCATG	Comprobación de las construcciones y transformantes	pSIL y pZEGA 1 (de pUC19)
pptUP	CTGACTCGTGAGCCTCACCTGCTG	Comprobación de las construcciones y transformantes / Obtención de sondas para análisis tipo <i>Southern</i>	<i>Pphi1</i> (extremo 3')
Q74F	CAAGCAATGTGTCCCGACTG	Obtención de sondas para análisis tipo <i>Northern</i>	<i>qid74</i> (interno)
Q74R	CCTGCTTGTGACACGCACTTC	Obtención de sondas para análisis tipo <i>Northern</i>	<i>qid74</i> (interno)
18S-u	CCGCGAAACTGCGAATGGC	Obtención de sondas para análisis tipo <i>Northern</i>	ARNr 18S
18S-r	CTTGTTACGACTTTTACTTCCTC	Obtención de sondas para análisis tipo <i>Northern</i>	ARNr 18S
CS-Factin	CGTGCTGGATTCTGGTGATGG	Normalización de carga (gen de pepino)	<i>act</i>
CS-Ractin	TCTGGGCAACGGAATCTCTCA	Normalización de carga (gen de pepino)	<i>act</i>
CHIT1 F	TGGTCACTGCAACCCTGACA	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>chit1</i>
CHIT1 R	AGTGGCCTGGAATCCGACT	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>chit1</i>

Tabla 8. Continuación.

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	UTILIDAD	SITIO DE UNIÓN
ETR F	GCCATTGTTGCAAAAGCAGA	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>etr</i>
ETR R	GCCCAAGACCACTGCCACA	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>etr</i>
bGLC F	TGGAGAAGAATGGTGGAGG	Expresión de genes de defensa en pepino	β - <i>gluc</i>
bGLC R	CTCATCAGACATAGCAAACAC	Expresión de genes de defensa en pepino	β - <i>gluc</i>
PAL1 F	ATGGAGGCAACTTCCAAGGA	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>pal1</i>
PAL1 R	CCATGGCAATCTCAGCACCT	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>pal1</i>
HPL F	TCTCGCCATGACAGGTTTCATC	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>hpl</i>
HPL R	GAACATTCCAGGTCCATCAGC	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>hpl</i>
LOX F	AAGGTTTGCCTGTCCCAAGA	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>lox</i>
LOX R	TGAGTACTGGATTA ACTCCAGCCAA	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>lox</i>
PRX F	AGAGCAACAAGGTCGGTTTCA	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>prx</i>
PRX R	GTGCCGACATCCTAGCTCAAG	Expresión de genes de defensa en pepino	<i>prx</i>
Q2413f	TGGCGTTGAATTGAGTTTGTGT	Cuantificación de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 "in planta"	Marcador SCAR
Q2413r	CCCTCCGTATGGGTTTTAAGGT	Cuantificación de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 "in planta"	Marcador SCAR

6.3. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

6.3.1. A pequeña escala: "boiling minipreps"

Este método de extracción se empleó para la obtención rutinaria de ADN plasmídico de *E. coli* (Sambrook y Russell, 2001):

1. Inocular 3 mL de medio LB, con el antibiótico apropiado, con una colonia de *E. coli*.
2. Incubar a 37°C y 200 rpm durante la noche (16 h aproximadamente).
3. Recoger 700 µL de células mediante centrifugación a 10.000 *g* durante 2 min. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender las células en 110 µL de tampón STET-L.
5. Incubar 30 seg a 100°C.
6. Centrifugar a 13.000 *g* durante 10 min.
7. Retirar el precipitado con un palillo estéril impregnado en una solución de ARNasa a 10 mg/mL (ribonucleasa A).
8. Precipitar el ADN plasmídico añadiendo 110 µL de isopropanol y mezclar por inversión.
9. Centrifugar a 13.000 *g* durante 10 min y descartar el sobrenadante.
10. Lavar el precipitado con etanol al 70% (v/v) y centrifugar a 13.000 *g* durante 5 min.
11. Secar y resuspender el ADN en 30 µL de agua ultrapura estéril.

Tampón STET: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, sacarosa al 8% (p/v), EDTA 50 mM, Triton X-100 al 5% (v/v).

Tampón STET-L: Añadir 10 µL de una solución de lisozima (10 mg/mL) por cada 1.400 µL de tampón STET. Prepararla al momento de usar.

6.3.2. Lisis alcalina a pequeña escala

Este método de extracción se utilizó cuando fue necesario obtener ADN de calidad óptima para la secuenciación automática. La extracción se llevó a cabo utilizando el *kit* comercial Ultraclean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep (Mo Bio), según las instrucciones del fabricante. El método consiste en una lisis alcalina de las células seguida de la purificación del ADN por afinidad a una resina. A partir de un cultivo de *E. coli* de 3 mL se consigue purificar hasta 20 µg de ADN plasmídico en un volumen final de 50 µL.

6.3.3. Lisis alcalina a gran escala

Este método de extracción se utilizó cuando fue necesario procesar volúmenes de cultivo bacteriano superiores a 50 mL con la finalidad de obtener gran cantidad de ADN de calidad óptima para la transformación de protoplastos de *T. harzianum*. La extracción se llevó a cabo utilizando el *kit* comercial NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel), según las instrucciones del fabricante. El método consiste en una lisis alcalina de las células seguida de la purificación del ADN basada en la afinidad por una resina de intercambio aniónico. A partir de un cultivo de *E. coli* de 50-100 mL se consigue purificar hasta 250 µg de ADN plasmídico.

6.4. Extracción de ADN genómico

6.4.1. Extracción rápida de ADN de *Trichoderma* spp. a pequeña escala

Este método de extracción de ADN, tomado de van Zeijl y col. (1998), se utilizó para la obtención de ADN cuando fue necesario analizar simultáneamente un gran número de muestras fúngicas mediante PCR (apartado 6.11):

1. Preparar en una microplaca estéril de 96 pocillos (con tapa) con 200 μ L de medio PDB por pocillo.
2. Inocular cada pocillo con esporas de *Trichoderma* spp. (obtenidas según se describió en el apartado 4.1), utilizando un palillo estéril.
3. Incubar a 28°C hasta conseguir un crecimiento algodonoso del micelio (40-45 h aproximadamente).
4. Transferir con un palillo estéril el micelio a un tubo de microcentrífuga conteniendo 50 μ L de tampón KC y Novozyme 234 (*InterSpec Products*) (2,5 mg/mL).
5. Incubar a 37°C durante 60 min.
6. Añadir 150 μ L de tampón de dilución.
7. Incubar a 95°C durante 3 min.
8. Colocar en hielo y dejar que los restos de micelio sedimenten durante 5 min.
9. Utilizar 1 μ L de este sobrenadante como material de partida para la reacción de PCR. Mantener a 4°C.

Tampón KC: KCl 0,8M, ácido cítrico 10mM pH 6,2.

Tampón de dilución: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 10 mM, EDTA 1mM.

6.4.2. Extracción de ADN de *Trichoderma* spp. a gran escala

Este método de extracción se empleó para la obtención de ADN de *Trichoderma* spp. en cantidad suficiente para llevar a cabo hibridaciones tipo *Southern*:

1. Pulverizar el micelio (obtenido como se describió en el apartado 4.4) en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Homogeneizar cuidadosamente 0,2-0,4 g del tejido pulverizado con 4 mL de tampón de extracción atemperado a 65°C, con la ayuda de una micropipeta con la punta cortada.
3. Añadir 250 μ L de SDS al 10% (p/v), mezclar por inversión e incubar a 65°C durante 30 min, agitando manualmente cada 10 min.
4. Añadir 1,2 mL de acetato de potasio 3M pH 5,5 y mantener en hielo durante 30 min. Mover esporádicamente.
5. Centrifugar a 18.000 g a 4°C durante 10 min.
6. Filtrar el sobrenadante a través de un embudo de papel de filtro humedecido con acetato potásico 3M pH 5,5.
7. Añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar por inversión.
8. Centrifugar a 18.000 g a 4°C durante 10 min y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
9. Repetir los pasos 7 y 8.
10. Añadir un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y mezclar por inversión.
11. Transferir a un tubo de vidrio Corex® y precipitar el ADN mediante adición de 2,5 volúmenes de etanol al 100% frío (-20°C). Mantener a -80°C durante 1 h.

12. Centrifugar a 13.000 g a 4°C durante 20 min. Descartar el sobrenadante.
13. Lavar con 4 mL de etanol al 70% (v/v) y repetir el paso anterior.
14. Resuspender el precipitado en 700 µL de tampón TER e incubar a 37°C durante 30 min.
15. Añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar por inversión.
16. Centrifugar a 13.000 g a 4°C durante 5 min.
17. Recoger la fase acuosa y precipitar mediante la adición lenta de un volumen de isopropanol. Mezclar por inversión y repetir el paso 16. Descartar el sobrenadante.
18. Secar el precipitado a temperatura ambiente durante 5 min y resuspender en 200 µL de agua ultrapura o tampón TE.
19. Comprobar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (apartado 6.7.1) y cuantificar espectrofotométricamente (apartado 6.8.1). Conservar a -20°C hasta su uso. Con este método se obtiene un rendimiento aproximado de 100 µg de ADN.

Tampón de extracción: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 20 mM.

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM.

Tampón TER: Tampón TE con ARNasa al 0,01% (p/v).

6.4.3. Extracción de ADN de plantas a pequeña escala

Este método de extracción tomado de Dellaporta y col. (1983), se utilizó en la obtención de ADN de raíces de pepino inoculadas con *T. harzianum*, con el fin de cuantificar ADN fúngico "in planta" mediante PCR a tiempo real:

1. Pesar entre 0,15-0,2 g de tejido vegetal fresco y pulverizar en un mortero en presencia de nitrógeno líquido.
2. Pasar el tejido pulverizado a un tubo de microcentrífuga y añadir 750 µL de tampón de extracción frío, mezclar y mantener en hielo.
3. Añadir 50 µL de SDS al 20% (p/v), mezclar cuidadosamente e incubar a 65°C durante 20 min. Mezclar esporádicamente.
4. Añadir 250 µL de acetato sódico 3M pH 5,2 frío, mezclar y mantener en hielo durante 20 min.
5. Centrifugar a 11.000 g durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Decantar el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 2 mL conteniendo 200 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar por inversión.
7. Centrifugar 11.000 g durante 2 min a temperatura ambiente.
8. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo.
9. Repetir los pasos 6, 7 y 8.
10. Precipitar el ADN por adición de 600 µL de isopropanol, mezclar cuidadosamente y mantener 10 min a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 11.000 g durante 5 min a temperatura ambiente.
12. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v), centrifugar como en el paso anterior.
13. Secar el precipitado al aire y resuspender en 100 µL de agua ultrapura estéril con ARNasa al 0,001% (p/v).
14. Incubar a 37°C durante 30 min.

15. Comprobar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (apartado 6.7.1) y cuantificar espectrofotométricamente (apartado 6.8.1). Conservar a -20°C hasta su uso.

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M. Autoclavar.

6.5. Extracción de ARN

Todas las soluciones utilizadas durante la manipulación de ARN se prepararon con agua ultrapura tratada durante 12 h con DEPC al 0,1% (v/v), y posteriormente autoclavada, con el fin de reducir el riesgo de degradación del ARN por la acción de ARNasas. El material de plástico se utilizó a partir de lotes nuevos y autoclavados. El material de vidrio, porcelana o metal se esterilizó en una estufa a 200°C durante 2 h.

6.5.1. Extracción de ARN total de *Trichoderma* spp.

Las extracciones de ARN de *Trichoderma* spp. se realizaron siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Pulverizar micelio liofilizado (obtenido según se describió en el apartado 4.5) en un mortero en presencia de nitrógeno líquido.
2. Pesar aproximadamente 7 mg de micelio puro pulverizado (36 mg en el caso de micelio crecido en presencia de quitina o paredes celulares) en un tubo de microcentrífuga.
3. Añadir 1 mL del reactivo TRI Reagent® (Ambion®, Applied Biosystems) y homogeneizar con ayuda de un *vortex*.
4. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
5. Añadir 200 µL de cloroformo y homogeneizar con ayuda de un *vortex* durante 15 s.
6. Incubar 3 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C.
8. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo (recoger en torno al 40% del volumen inicial de partida).
9. Añadir 500 µL de isopropanol y mezclar por inversión.
10. Incubar 15 min a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C.
12. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 mL de etanol-DEPC al 75% (v/v) con ayuda de un *vortex* hasta disgregarlo.
13. Centrifugar a 7.500 g durante 5 min a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
14. Resuspender el precipitado en 45 µL de agua-DEPC e incubar durante 5 min a 60°C para favorecer la solubilización del ARN.
15. Comprobar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (apartado 6.7.2.1) y cuantificar espectrofotométricamente (apartado 6.8.1). Conservar a -20°C hasta su uso. Con este método se obtiene un rendimiento aproximado de 200 µg de ARN total.

6.5.2. Extracción de ARN total de plantas

La extracción de ARN de plantas se realizó a partir de 100 mg de tejido vegetal fresco pulverizado en mortero en presencia de nitrógeno líquido, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior con un paso adicional de centrifugación para eliminar el alto contenido de polisacáridos presente en la pared celular vegetal. Para ello, entre los pasos 2 y 3, se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo y se procedió a la adición de cloroformo para la separación de fases (paso 3).

6.6. Síntesis de ADNc a partir de ARN vegetal

Con el fin de llevar a cabo el análisis de la expresión de genes mediante PCR a tiempo real (apartado 6.11.2) se sintetizó ADNc a partir del ARN total extraído de plantas de pepino según se indicó en el apartado anterior. Las reacciones de síntesis de ADNc se realizaron utilizando un oligonucleótido poli-T y el *kit* comercial Reverse Transcription System (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADNc obtenido se conservó a -80°C hasta su uso. Como controles negativos se llevaron a cabo reacciones sin retrotranscriptasa.

6.7. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

6.7.1. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Mezclar la cantidad necesaria de agarosa (0,8-1,2% p/v) con tampón TAE 1x y fundir en un microondas.
2. Dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C y añadir BrEt a una concentración final de 1 µg/mL (alternativamente se puede hacer la tinción al final de la carrera electroforética, sumergiendo el gel en tampón TAE 1x conteniendo BrEt a 1 µg/mL durante 10 min).
3. Verter el gel en la bandeja de electroforesis y dejar que solidifique.
4. Preparar las muestras añadiendo tampón de carga 6x (5:1).
5. Llevar a cabo la electroforesis en tampón TAE 1x aplicando un voltaje aproximado de 5 V/cm de longitud del gel, incluyendo marcadores de pesos moleculares conocidos (**Figura 50**).
6. Visualizar las bandas mediante iluminación con luz ultravioleta (se utilizaron los aparatos FirstLight™ UV Illuminator, UVP y BioDoc-It™ Imaging System, UVP).

Tampón TAE 50x: Tris-acetato 2 M pH 8,0, EDTA 0,05 M. Autoclavar.

Tampón de carga 6x: Azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), ficoll 400 15% (p/v).

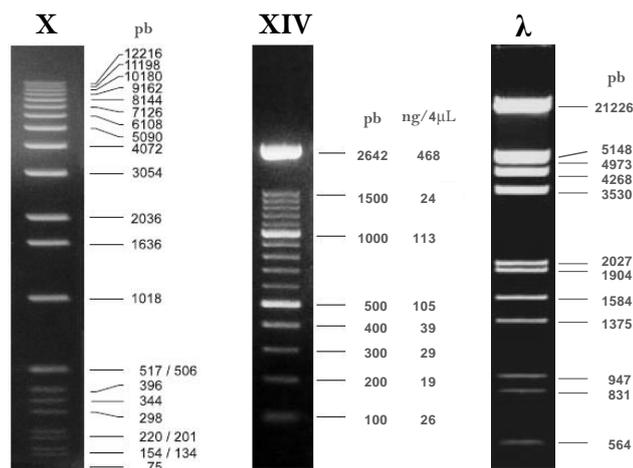


Figura 50. Marcadores de peso molecular de ADN empleados en este trabajo. X y XIV, marcadores comerciales (Roche). λ , ADN del fago lambda digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

6.7.2. Electroforesis de ARN

Para la electroforesis de muestras de ARN los tampones se prepararon con agua tratada con DEPC al 0,1% (v/v). Las bandejas y los peines de electroforesis se trataron con una solución de H_2O_2 al 3% (v/v) durante al menos 30 min. y posteriormente se lavaron con agua-DEPC.

6.7.2.1. En condiciones no desnaturalizantes

La integridad de los extractos de ARN obtenidos se comprobó mediante visualización con luz ultravioleta después de electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) (según se describió en el apartado anterior para muestras de ADN). Como se muestra en la **Figura 51** en un extracto de ARN total íntegro se aprecian nítidamente las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S, viéndose esta última aproximadamente dos veces más intensa que la primera.

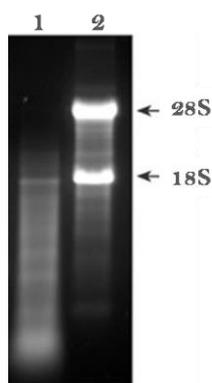


Figura 51. Apariencia de muestras de ARN total sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). En el carril 1 se presenta una muestra de ARN degradado, y en el carril 2 una muestra de ARN íntegro. Las bandas 18S y 28S del ARN ribosómico son claramente visibles en la muestra del carril 2.

6.7.2.2. En condiciones desnaturalizantes

La separación de moléculas de ARN en estas condiciones se realizó en geles de agarosa al 1,2% (p/v) preparados con tampón MOPS 1x, en presencia de formaldehído como agente

desnaturalizante, con el objeto de evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN para los experimentos de hibridación tipo *Northern*:

1. Para un gel de 200 mL, disolver 2,4 g de agarosa en 144 mL de agua-DEPC y fundir en un microondas.
2. Dejar enfriar hasta aproximadamente 60°C y añadir 20 mL de tampón MOPS 10x y 36 mL de formaldehído al 37%. Trabajar desde este paso dentro de una campana de extracción.
3. Mezclar y verter el gel en la bandeja de electroforesis, dejar que solidifique.
4. Preacondicionar el gel sometándolo a 5 V/cm de longitud del gel durante 30 minutos en tampón MOPS 1x.
5. Mientras tanto, preparar las muestras mezclando 4,5 µL de ARN (aproximadamente 20 µg), 2 µL de tampón MOPS 10x, 3,5 µL de formaldehído al 37% y 10 µL de formamida desionizada.
6. Desnaturalizar las muestras a 65°C durante 15 min. Pasarlas inmediatamente a hielo durante 5 min y añadir 4 µL de tampón de carga 6x (apartado 6.7.1).
7. Cargar las muestras en el gel y llevar a cabo la electroforesis en tampón MOPS 1x, aplicando un voltaje de 5 V/cm de longitud del gel durante 3-4 h.
8. Una vez finalizada la electroforesis se llevó a cabo la transferencia del ARN a membranas para su posterior hibridación con las sondas correspondientes (*Northern blot*, apartado 6.13.1.2).

Tampón MOPS 10x: MOPS 0,2 M, acetato sódico 0,05 M, EDTA 0,01 M. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH. Conservar a temperatura ambiente protegido de la luz.

6.8. Cuantificación de ácidos nucleicos

6.8.1. Mediante espectrofotometría

La cantidad y pureza de las preparaciones de ADN y ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, que permite leer su concentración en ng/µL a partir de 1 µL de muestra (considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 o 40 ng/µL de ADN o ARN, respectivamente). Un cociente $\geq 1,8$ o ≥ 2 entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm es característico de una preparación altamente pura de ADN o ARN, respectivamente.

6.8.2. Mediante electroforesis

La cuantificación de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa (apartado 6.7.1) se llevó a cabo por comparación con marcadores de peso molecular de concentración conocida (**Figura 50**).

6.8.3. En placa Petri con BrEt

Este método se utilizó como alternativa al método espectrofotométrico para cuantificar muestras de ADNc. Se prepararon placas Petri de 9 cm de diámetro con 10 mL de agarosa al 0,8% (p/v) conteniendo BrEt (1 µg/mL). Una vez solidificada la agarosa, se depositó en el centro de la placa 0,5 µL de la muestra a cuantificar. La muestra se dejó secar durante unos 10 minutos. La cantidad de ADNc se determinó por visualización con luz ultravioleta comparando con patrones de ADN de concentración conocida (5-100 ng/µL) preparados en solución de EDTA 100 mM y dispuestos según se muestra en la **Figura 52**.

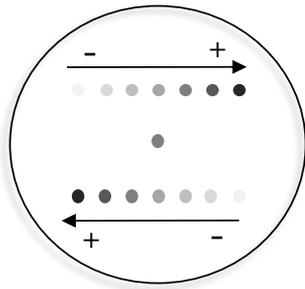


Figura 52. Esquema en el que se representa la disposición de una muestra problema de ADNc (colocada en el centro) para su cuantificación aproximada por comparación con patrones de ADN de concentración conocida, en placa Petri conteniendo agarosa con BrEt. Las flechas indican el gradiente de concentración de los patrones de ADN.

6.9. Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de fragmentos de ADN, bien a partir de geles de agarosa o de muestras en solución, se llevó a cabo utilizando el *kit* comercial Nucleospin® Extract II (Macherey-Nagel), según las especificaciones del fabricante.

6.10. Manipulación enzimática de ácidos nucleicos

6.10.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo en los tampones y condiciones adecuadas recomendadas por la firma comercial que proporciona cada enzima. Normalmente, se utilizaron de 1-2 U enzima/ μg ADN, en un volumen final de 20 μL , durante 4 h. En el caso de no encontrar tampones compatibles para digestiones con dos enzimas de restricción, las reacciones se realizaron en dos pasos.

6.10.2. Desfosforilación de ADN plasmídico

Las reacciones de desfosforilación de ADN se llevaron a cabo utilizando la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternero (Roche). Esta enzima cataliza la eliminación de un grupo fosfato 5' de una cadena de ADN. Es conveniente desfosforilar un vector que ha sido digerido con una enzima de restricción con la finalidad de evitar la religación del mismo. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 μL conteniendo tampón 1x (preparado a partir del tampón 10x proporcionado con la enzima), 1 pmol de ADN digerido y 1 U de enzima. Se incubó a 37°C durante 1 h y se inactivó incubando a 65°C durante 10 min. El ADN plasmídico desfosforilado se purificó según se indicó en el apartado 6.9 para su utilización en reacciones de ligación de moléculas de ADN.

6.10.3. Ligación

Las reacciones de ligación de moléculas de ADN se llevaron a cabo con la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche). Este enzima cataliza la unión covalente de extremos cohesivos o romos de ADN mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre los grupos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato libres. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final máximo de 20 μL de tampón 1x (preparado a partir del tampón 10x proporcionado con la enzima) conteniendo ADN del vector (150-200 ng) y ADN del inserto (en una proporción molar 1:6), y 2 U de enzima. Las reacciones se incubaron a 12°C durante toda la noche, y se utilizaron directamente para la transformación de células competentes de *E. coli* (apartado 6.14.1).

6.11. Amplificación de ADN: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.11.1. PCR a tiempo final

Esta técnica permite la amplificación de fragmentos de ADN de forma exponencial (Mullis y col., 1986). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Las condiciones generales de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos que consistieron en: 30 seg a 94°C (desnaturalización), 30 seg a la temperatura establecida empíricamente para cada par de oligonucleótidos (hibridación) y 1 min a 72°C por cada kb a amplificar (extensión); terminando con un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 min. El tamaño y la cantidad del producto amplificado se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (apartados 6.7.1 y 6.8.2).

6.11.1.1. PCR de rutina

Aquellas reacciones en las que se utilizó la enzima ADN polimerasa convencional de *Thermus* sp. (Biotools) se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL conteniendo el ADN molde (ADN plasmídico: 0,1-1 ng; ADN genómico: 10-100 ng), tampón de PCR 1x (preparado a partir del tampón 10x proporcionado con la enzima, incluyendo 20 mM de MgCl₂), 200 µM de dNTPs, 0,4 µM de cada oligonucleótido, 1,25 U de enzima y agua ultrapura c.s.p. 25 µL.

6.11.1.2. PCR de alta fidelidad

En los casos en los que se requirió una amplificación de alta fidelidad de copia se utilizó la enzima *Pfu* ADN polimerasa (obtenida de la arquea *Pyrococcus furiosus*) (Biotools) que, por presentar actividad correctora de errores 3'→5', incorpora 10 veces menos errores en el proceso de amplificación que una polimerasa convencional. Los productos amplificados con esta enzima pueden ser directamente utilizados para ligaciones de extremos romos, ya que no presenta actividad transferasa terminal.

6.11.1.3. PCR de fragmentos largos

La amplificación de fragmentos largos de ADN (> 2 kb) se llevó a cabo utilizando el sistema Triple Master® PCR System (Eppendorf), según las especificaciones del fabricante. Este sistema combina la enzima *Taq* ADN polimerasa termoestable (de *Thermus aquaticus*) con un enzima que presenta actividad correctora 3'→5', además de un aditivo (*polymerase enhancing factor*) que aumenta la procesividad de las enzimas, lo que permite amplificar fragmentos largos y complejos evitando la incorporación de errores.

6.11.1.4. PCR de colonia

Cuando fue necesario analizar un gran número de clones bacterianos, se realizó un escrutinio preliminar por PCR directa de cada colonia. Para ello, la mezcla de reacción se preparó según se describe en el apartado 6.11.1.1 reemplazando el ADN por una pequeña cantidad de la colonia de interés (picando la colonia de la placa con una punta estéril y extendiendo la biomasa en el fondo del tubo antes de añadir la mezcla de reacción).

6.11.2. PCR a tiempo real (PCR cuantitativa)

La base de esta reacción es la misma que la de la PCR convencional (apartado 6.11.1) con la diferencia de que incluye la presencia de un fluoróforo (uno de los más utilizados es el agente intercalante SYBR Green I) en la mezcla de reacción, lo cual permite hacer un seguimiento a tiempo real del proceso de amplificación. Para ello, se emplea un termociclador capaz de medir el aumento de la intensidad de fluorescencia emitida a medida que se va acumulando el fragmento de

ADN amplificado (amplicón). Además, se trata de una reacción cuantitativa que permite calcular la cantidad de ADN presente en la muestra analizada, teniendo en cuenta que el primer ciclo de la reacción en el que empieza a detectarse aumento de fluorescencia (C_t , *cycle threshold*) es proporcional a dicha cantidad de ADN (**Figura 53**).

En todos los casos las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador ABI Prism™ 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las condiciones generales de amplificación consistieron en un ciclo inicial a 95°C durante 10 min (activación de la enzima y desnaturalización del ADN), seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 seg (desnaturalización) y 60°C durante 1 min (hibridación y extensión). Tras la amplificación, se incluyó un paso de disociación en el que se realiza una medida continua de la fluorescencia emitida en un rango de 60-95°C aumentando la temperatura 0,2°C/s. Este paso permite identificar la presencia de dímeros y verificar la especificidad de la reacción analizando las curvas de disociación del amplicón.

Todas las reacciones se prepararon en microplacas de 96 pocillos, utilizando el *kit* comercial Kapa SYBR® Fast qPCR Kit Master Mix (2x) ABI Prism™ (Kapa) en un volumen final de 10 uL, conteniendo 1 uL de ADN molde. Cada muestra se amplificó por triplicado.

Los cálculos para determinar la cantidad de ADN en las muestras analizadas se realizaron utilizando el método de la curva estándar para cuantificación relativa. Para ello, se construyeron curvas estándar para cada una de las parejas de oligonucleótidos utilizando como molde diluciones seriadas de una cantidad indeterminada de ADN. La ecuación de la recta obtenida en cada caso permite el cálculo de la cantidad de ADN inicial en la muestra problema, a partir del valor C_t obtenido para dicha muestra (**Figura 53**).

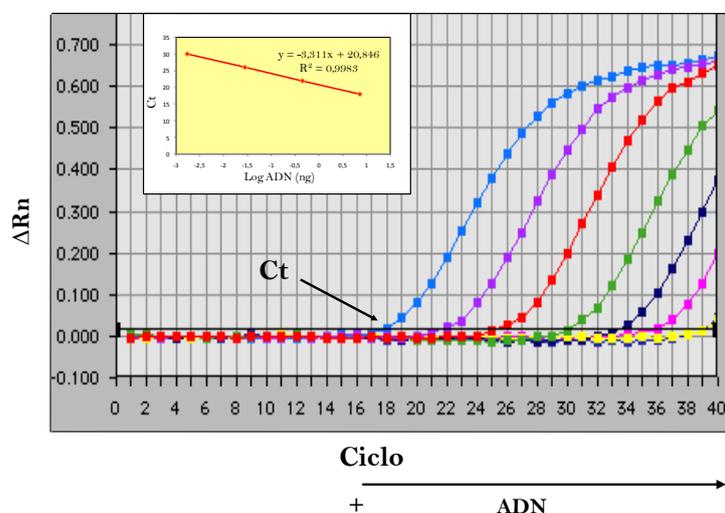


Figura 53. Cuantificación de ADN mediante PCR a tiempo real utilizando el método de la curva estándar. En la gráfica se representan valores de fluorescencia obtenidos a partir de diluciones seriadas de una muestra de ADN. En el eje de las abscisas se indican los ciclos de amplificación y en el eje de las ordenadas los valores de la fluorescencia (ΔRn). El valor C_t (primer ciclo en el que se detecta aumento de fluorescencia) es inversamente proporcional a la cantidad de ADN presente en cada muestra. La ecuación de la recta obtenida permite deducir por extrapolación la cantidad de ADN en una muestra problema a partir del valor C_t obtenido para dicha muestra.

6.12. Secuenciación de ADN

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca, siguiendo sus recomendaciones para la preparación de las muestras. La secuenciación se realizó a partir de 500 ng de ADN plasmídico (apartado 6.3.2) o de 100 ng por kb de longitud en el caso de productos de PCR (purificados según el apartado 6.9), añadiendo 3 pmol del oligonucleótido de interés por reacción.

6.13. Análisis de hibridación de ácidos nucleicos en membranas

6.13.1. Transferencia de ácidos nucleicos a membranas

6.13.1.1. Transferencia de ADN (*Southern blot*)

Se realizaron digestiones (apartado 6.10.1) de 10 µg de ADN_g de *T. harzianum* (extraído según se indicó en el apartado 6.4.2). Los fragmentos de ADN originados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) con BrEt (apartado 6.7.1), aplicando bajo voltaje (2 V/cm de longitud de gel). También se incluyó un marcador de peso molecular. Terminada la electroforesis, se visualizó el gel con luz ultravioleta y se comprobó la eficiencia de la carrera y de la digestión (se debe observar un rastro de ADN a lo largo del carril y bandas definidas debido a secuencias repetitivas de ADN). Posteriormente, el gel se trató siguiendo el protocolo detallado a continuación:

1. Sumergir el gel en HCl 0,25 N durante aproximadamente 20 min con agitación suave. Este paso de depurinación, facilita la transferencia de ADN de alto peso molecular a la membrana. Lavar tres veces con agua destilada durante 5 min.
2. Sumergir el gel en solución de desnaturalización durante 20 min con agitación suave. Repetir y lavar el gel brevemente con agua destilada.
3. Sumergir el gel en solución de neutralización durante 20 min con agitación suave. Repetir y lavar brevemente con agua destilada.
4. Equilibrar el gel en tampón SSC 20x durante 30 min con agitación suave.
5. Llevar a cabo la transferencia por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Hybond™ N⁺, Amersham), situando el gel sobre un puente de papel de filtro Whatman® 3MM cuyos extremos están en contacto con tampón SSC 20x y saturado con el mismo. Sobre el gel, colocar sucesivamente, la membrana de nailon del tamaño del gel (previamente sumergida en SSC 2X), tres papeles Whatman® 3MM, una pila de papel absorbente y finalmente un peso de aproximadamente 0,5 kg. Evitar las burbujas de aire entre capa y capa. El sistema de transferencia se esquematiza en la **Figura 54**.
6. Tras la transferencia (mínimo 12 h), desmontar el sistema, sumergir la membrana en tampón SSC 2x durante 2 min para retirar el exceso de sales y secarla al aire.
7. Una vez seca, el ADN se fija covalentemente a la membrana por irradiación con luz ultravioleta, para lo cual se utilizó un *crosslinker* (TL-2000 Ultraviolet Translinker, UVP) aplicando 120 mJ/cm² durante 30 s. Alternativamente, la membrana se puede hornear a 80°C durante 2 h.
8. Conservar la membrana a temperatura ambiente entre papeles de filtro hasta su hibridación.

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

Solución de neutralización: NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,5.

Tampón SSC 20x: NaCl 3 M, citrato trisódico 0,3 M. Ajustar a pH 7,0 con HCl 1 M.

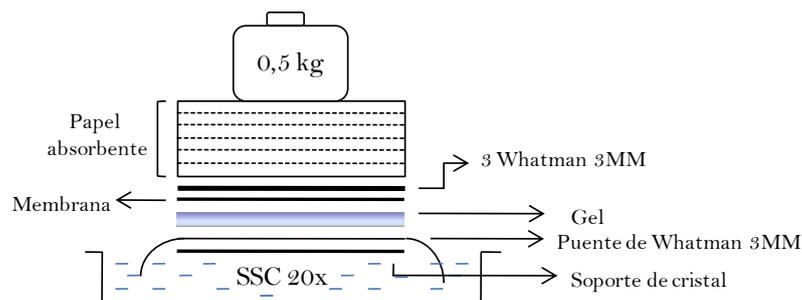


Figura 54. Representación esquemática del sistema de transferencia de ADN a membranas por capilaridad (*Southern blot*).

6.13.1.2. Transferencia de ARN (*Northern blot*)

Las muestras de ARN (20-30 μg) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes (apartado 6.7.2.2). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó en agua-DEPC durante 5 min y se equilibró en tampón SSC 20x (preparado también con agua-DEPC) durante 30 min con agitación suave. La transferencia y posterior inmovilización del ARN a la membrana se realizó como se describió en el apartado anterior (pasos 5-8).

6.13.2. Marcaje e hibridación con sondas de ADN no radiactivas

Este método tiene la ventaja de no requerir el uso de material radiactivo debido a que las sondas son marcadas con digoxigenina (DIG), y posteriormente detectadas mediante una reacción de quimioluminiscencia utilizando anticuerpos anti-DIG conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. Sin embargo presenta la desventaja de ofrecer menor sensibilidad que el uso de sondas de ADN marcadas radiactivamente.

Las sondas de ADN se obtuvieron mediante PCR convencional (apartado 6.11.1.1) a partir de ADN_g o ADN_p utilizando el *kit* comercial PCR DIG Labeling Mix (Roche) según las instrucciones del fabricante. Este *kit* permite la incorporación de moléculas DIG unidas covalentemente al nucleótido dUTP, el cual sustituirá a nucleótidos dTTP. El marcaje se comprobó mediante electroforesis (apartado 6.7.1) de una alícuota de la reacción en paralelo con una muestra control sin marcar (la sonda marcada debe presentar un mayor peso molecular). En el caso de observarse solo una banda de amplificación, la sonda marcada se utilizó directamente en la reacción de hibridación (20-50 ng/mL de tampón de hibridación); de lo contrario, se procedió a purificar la banda de interés marcada a partir del gel de agarosa mediante columnas (apartado 6.9). Las sondas se conservaron a -20°C hasta su uso.

El protocolo utilizado para la hibridación de membranas con sondas de ADN no radiactivas se detalla a continuación:

1. Introducir la membrana en un tubo de hibridación y añadir el tampón utilizando el mínimo volumen posible que permita cubrir por completo la membrana.
2. Preincubar a $50/65^{\circ}\text{C}$ (para membranas con ARN/ADN respectivamente) con agitación constante en un horno de hibridación durante un mínimo de 30 min.
3. Añadir la sonda de ADN marcada y desnaturalizada al tampón de hibridación.
4. Incubar a la misma temperatura que en el paso 2, según corresponda, en un horno de hibridación durante un mínimo de 12 h.
5. Retirar el tampón de hibridación con la sonda (se puede conservar a -20°C para ser reutilizado) y reemplazar por tampón de lavado I (lavado poco restrictivo).

6. Lavar dos veces a temperatura ambiente con agitación durante 5 min cada vez.
7. Descartar y reemplazar por tampón de lavado II (lavado más restrictivo) atemperado a 50/65°C (para membranas con ARN/ADN respectivamente).
8. Lavar dos veces a 50/65°C (según el caso) con agitación durante 15 min cada vez.
9. Incubar la membrana en tampón de lavado III a temperatura ambiente durante 2 min con agitación.
10. Descartar y añadir solución de bloqueo 1x.
11. Incubar durante al menos 30 min con agitación.
12. Descartar y añadir la solución del anticuerpo.
13. Incubar durante 30 min con agitación.
14. Descartar y lavar dos veces con solución de lavado III durante 15 min cada vez.
15. Descartar y equilibrar la membrana 3 min en tampón de detección.
16. Colocar la membrana sobre una película de plástico transparente y aplicarle el volumen suficiente de sustrato diluido 1:100 en tampón de detección. La detección quimioluminiscente se realiza con el sustrato CDP-Star (Roche) y el conjugado fosfatasa alcalina anti-digoxigenina (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche). La fosfatasa alcalina cataliza la producción de luz mediante descomposición enzimática del sustrato.
17. Cubrir la membrana con el plástico transparente evitando la formación de burbujas e incubar 5 min en oscuridad.
18. Exponer la membrana directamente en un equipo de captura quimioluminiscente Fujifilm LAS-1000.

Tampón de hibridación: SSC 5x, blocking reagent (Roche) 1% (p/v), sarcosina 0,1% (p/v), SDS 0,02% (p/v).

Tampón de lavado I: SSC 2x, SDS 0,1% (p/v).

Tampón de lavado II *Northern*: SSC 0,1x, SDS 0,1% (p/v).

Tampón de lavado II *Southern*: SSC 0,5x, SDS 0,1% (p/v).

Tampón maleico: NaCl 150 mM, ácido maleico 100 mM. Ajustar a pH 7,5 con NaOH sólido.

Tampón de lavado III: Tween® 20 0,3% (v/v) en tampón maleico.

Solución *stock* de bloqueo 10x: *Blocking reagent* 10% (p/v). Disolver con calor, autoclavar y almacenar a 4°C.

Solución de bloqueo 1x: Diluir la solución *stock* 10x 1:10 en tampón maleico. Preparar en el momento de uso.

Solución del anticuerpo: Centrifugar el anticuerpo *Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments* (Roche) a 10.000 g durante 5 min antes de cada uso. Diluirlo 1:20.000 (35mU/mL) en la solución de bloqueo 1x.

Tampón de detección: Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M.

6.13.3. Marcaje e hibridación con sondas de ADN radiactivas

Las sondas de ADN se obtuvieron mediante PCR convencional a partir de ADN_g o ADN_p (apartado 6.11.1.1). Posteriormente, las sondas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (apartado 6.7.1) y se purificaron a través de columnas (apartado 6.9). El marcaje de las sondas con [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (3000 Ci/mmol) se realizó a partir de 50-100 ng de ADN purificado, utilizando el *kit* comercial Ready-to-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) (GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante. El marcaje se basa en la utilización de oligonucleótidos aleatorios para el inicio de la síntesis de la cadena complementaria de la sonda, reacción catalizada por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa. Una vez finalizada la reacción de marcaje, los nucleótidos no incorporados se

eliminaron utilizando columnas illustra™ MicroSpin™ S-400 HR (GE Healthcare), según las especificaciones del fabricante. Por último, las sondas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y se transfirieron inmediatamente a hielo hasta el momento de la hibridación.

El protocolo utilizado para la hibridación de membranas con sondas de ADN radiactivas se detalla a continuación:

1. Introducir la membrana con el ARN transferido en un tubo de hibridación y añadir el tampón, atemperado a 65°C, utilizando el mínimo volumen posible que permita cubrirla por completo.
2. Añadir la sonda de ADN marcada y desnaturalizada al tampón de hibridación.
3. Incubar a 65°C en un horno de hibridación durante un mínimo de 12 h.
4. Retirar el tampón de hibridación con la sonda (se puede conservar a -20°C para ser reutilizado).
5. Lavar con tampón de lavado a temperatura ambiente durante 1 min.
6. Descartar y lavar dos veces con tampón fresco a 65°C durante 15 min cada vez.
7. Envolver la membrana con una película de plástico transparente y exponerla en un casete BAS 2040 (Fujifilm) con pantalla intensificadora Imaging Plate BAS-MS 2040 (Fujifilm).
8. Capturar la imagen en un equipo Bio-Imaging Analyzer BAS-1500 (Fujifilm).

Tampón de hibridación: Tampón fosfato sódico 0,5 M pH 7,2, EDTA 10 mM, SDS 7% (p/v).

Tampón de lavado: Tampón fosfato sódico 40 mM pH 7,2, SDS 1% (p/v).

Tampón fosfato sódico 1M pH 7,2: NaH₂PO₄ 28% (v/v), Na₂HPO₄ 1M 72% (v/v).

6.13.4. Reutilización de membranas

Para la rehibridación de membranas es importante que no se hayan secado en los pasos anteriores, de lo contrario no será posible retirar la sonda.

El protocolo seguido para la rehibridación de membranas con sondas de ADN no radiactivas fue el siguiente:

1. Lavar la membrana con agua destilada durante 1 min.
2. Lavar la membrana dos veces con tampón de deshibridación a 37°C durante 15 min cada vez.
3. Descartar el tampón e incubar en SSC 2x durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Rehibridar la membrana o conservarla humedecida con SSC 2x hasta su reutilización.

Tampón de deshibridación: NaOH 0,2 M, SDS 0,1% (p/v).

El protocolo seguido para la rehibridación de membranas con sondas de ADN radiactivas fue el siguiente:

1. Lavar la membrana con agua destilada durante 1 min.
2. Sumergir la membrana en una solución de SDS al 0,2% (p/v) en ebullición.
3. Mantenerla en la solución hasta su enfriamiento.
4. Rehibridar la membrana o conservarla humedecida con SSC 2x hasta su reutilización.

6.14. Métodos de transformación de microorganismos

6.14.1. Obtención de células competentes y transformación de *E. coli* DH5 α

El protocolo utilizado para la preparación de células competentes de *E. coli* se basó en el método de Inoue y col. (1990):

1. Sembrar *E. coli* por agotamiento en estría en medio LB sólido, e incubar a 37°C durante 16 h.
2. Inocular 250 mL de medio SOC (en un matraz de 2 L) con colonias de la placa anterior. Incubar a 25°C y 200 rpm durante unas 20 h hasta alcanzar 0,6 unidades de absorbancia a 600 nm.
3. Mantener el cultivo en hielo durante 10 min y centrifugar a 5.000 *g* y 4°C durante 10 min.
4. Resuspender el precipitado en 40 mL de tampón TB frío y mantener en hielo durante 10 min.
5. Centrifugar nuevamente en las mismas condiciones y resuspender las células en 20 mL de tampón TB frío.
6. Añadir 1,4 mL de DMSO (concentración final del 7%) y mantener en hielo durante 10 min.
7. Preparar alícuotas de 90 μ L, congelar en nitrógeno líquido y conservar a -80°C.

Tampón TB: PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM. Ajustar el pH a 6,7 con KOH y añadir MnCl₂ 55 mM, filtrar a esterilidad y conservar a 4°C.

La transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α se realizó mediante choque térmico, siguiendo el método descrito por Hanahan (1983) y modificado por Inoue y col. (1990):

1. Descongelar las células competentes lentamente en hielo.
2. Añadir 10 μ L del ADN plasmídico procedente de la reacción de ligación (0,1-100 ng) con la que se desee llevar a cabo la transformación.
3. Mantener en hielo durante 30 min.
4. Incubar a 42°C durante 90 s.
5. Pasar a hielo inmediatamente y mantener durante 2 min.
6. Añadir 400 μ L de medio LB.
7. Incubar 40 min a 37°C.
8. Sembrar alícuotas en medio LB sólido con el antibiótico apropiado.
9. Incubar a 37°C hasta la aparición de colonias (16 h aproximadamente).
10. Sembrar las colonias de interés en tubos con 3 mL de medio LB líquido (con el antibiótico apropiado), incubar en agitación a 37°C durante 8 h y recoger las células por centrifugación para su posterior análisis como posibles clones transformantes.

6.14.2. Obtención y transformación de protoplastos de *T. harzianum*

La transformación de *T. harzianum* CECT 2413 se llevó a cabo tomando como referencia el protocolo desarrollado por Penttilä y col. (1987) y optimizado por Cardoza y col. (2006a):

1. Sembrar en placas con medio PDA esporas de *T. harzianum* a partir de un *stock* en glicerol, e incubar a 28°C durante 5-7 días, momento en el que el micelio desarrollado se debe encontrar completamente esporulado.

2. Recoger las esporas (apartado 4.1) y usarlas para inocular (con 5×10^8 esporas) 100 mL de medio CM en un matraz de 500 mL.
3. Incubar el matraz inoculado a 28°C a 250 rpm durante 17 h. Comprobar al microscopio que las esporas se encuentran germinadas y distribuidas sin formar agregados.
4. Filtrar las germínulas a través de un embudo con nailon estéril de 30 μm de diámetro de poro (nytal, Maissa), lavar con 100 mL de NaCl al 0,9% (p/v) y posteriormente con 100 mL de tampón TLT. Una vez lavado, retirar el exceso de humedad presionando con ayuda de papel de filtro estéril.
5. Resuspender 0,5 g del material fúngico en 50 mL de tampón TPT conteniendo DTT 25 mM (preparado en el momento) y agitar para resuspender completamente el micelio.
6. Incubar en un matraz de 500 mL a 30°C y 250 rpm durante 2 h.
7. Después del tratamiento con DTT, centrifugar a 8.500 g a 4°C durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante, lavar el *pellet* con 50 mL de tampón TPT y centrifugar nuevamente en las mismas condiciones.
8. Retirar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 20 mL de tampón TPT conteniendo enzimas líticas filtradas a esterilidad (Lysing Enzymes, Sigma) a una concentración final de 5 mg/mL.
9. Incubar en un matraz a 30°C y 80 rpm durante aproximadamente 2 h, controlando la formación de protoplastos al microscopio.
10. Una vez obtenidos los protoplastos, filtrar la suspensión a través de nailon estéril de 30 μm de diámetro de poro. Diluir el volumen recuperado 1:3 en solución ST y mezclar por inversión.
11. Centrifugar a 3.200 g durante 10 minutos para sedimentar los protoplastos. Retirar con cuidado el sobrenadante y lavar con 10 mL de solución ST, centrifugar nuevamente a 3.200 g durante 3 min y eliminar el sobrenadante.
12. Lavar con 10 mL de solución STC. Centrifugar a 3.200 g durante 3 min y retirar el sobrenadante.
13. Resuspender los protoplastos en 500 μL de tampón STC y hacer el recuento al microscopio utilizando una cámara Thoma. Generalmente se obtiene del orden de 5×10^7 - 5×10^8 protoplastos/mL.
14. Añadir 1/10 de volumen de solución PTC. Mantener la suspensión de protoplastos en hielo.
15. Mezclar en tubos de 10 mL en hielo, 8 μg del ADN plasmídico con el que se desea transformar disuelto en tampón TE, con 200 μL de la suspensión de protoplastos. El volumen de ADN no debe superar 1/10 del volumen de protoplastos. Se recomienda utilizar preferentemente ADN lineal para facilitar su integración en el genoma del hongo. En el caso de cotransformación (con dos plásmidos), el plásmido que lleva el gen marcador de selección y el plásmido que lleva el casete de expresión del gen de interés deben mantener una proporción 1:9, respectivamente.
16. Mantener la mezcla de transformación en hielo durante 20 min.
17. Añadir lentamente 1 mL de solución PTC y mezclar por inversión.
18. Mantener a temperatura ambiente durante 20 min.
19. Añadir 1,2 mL de solución STC para diluir los protoplastos y mezclar por inversión.
20. Mezclar alícuotas de 50-300 μL de la suspensión de transformación con 5 mL de medio TSA-Sac atemperado a 50°C conteniendo el antibiótico de selección apropiado (higromicina 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o fleomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
21. Verter esta mezcla sobre placas Petri de 5 cm de diámetro que contienen el mismo volumen de medio TSA-Sac selectivo previamente solidificado. En el caso de la

mezcla control sin ADN, añadirla también en medio sin antibiótico como control de regeneración de los protoplastos.

22. Dejar solidificar las placas e incubarlas a 28°C hasta la aparición de colonias aisladas (3-4 días).

La selección de los posibles transformantes obtenidos se llevó a cabo en medio TSA-Sac con 300 µg/mL de higromicina o 200 µg/mL de fleomicina como marcador de selección (el doble de la cantidad utilizada en el proceso de transformación de protoplastos). En total, se realizaron tres pases selectivos (el pase intermedio no lleva antibiótico de selección para asegurar la obtención de transformantes estables). Posteriormente, es recomendable preparar cultivos monospóricos de cada uno de los transformantes seleccionados (apartado 4.2).

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM.

Tampón TLT: Tampón fosfato sódico 10mM, MgSO₄ 0,6 M. Ajustar el pH a 5,8 y esterilizar en autoclave.

Tampón TPT: Tampón fosfato sódico 10 mM, MgSO₄ 0,8 M. Ajustar el pH a 5,8 y filtrar a esterilidad.

Tampón fosfato sódico 10 mM: Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM. Añadir la mitad del volumen de la forma básica e ir añadiendo de a pocos la forma ácida hasta llegar a un pH de 5,8.

Solución ST: Sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Autoclavar por separado *stocks* 1 M de cada solución y mezclar al momento de usar.

Solución STC: Sorbitol 1M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 20 mM. Autoclavar por separado *stocks* 1 M de cada solución y mezclar al momento de usar.

Solución PTC: PEG 6000 (Merck) al 60% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 20 mM. Autoclavar cada solución por separado y mezclar al momento de usar.

7. "Trichochip v. 1.0"

7.1. Secuencias de partida

Como secuencias de partida para el diseño de las sondas de oligonucleótidos incluidas en el *microarray* se utilizaron un total de 14.237 ESTs (11.376 *singlets* y 2.861 *contigs*) de 12 cepas de *Trichoderma* pertenecientes a 8 especies [CECT: *T. harzianum* T34 (CECT 2413); NBT: *T. longibrachiatum* T52 (NBT52), *T. virens* T59 (NBT59), *T. viride* T78 (NBT78); ATCC: *T. atroviride* TP1 (ATCC 74058), *T. harzianum* T22 (ATCC 20847), *T. harzianum* T3K (ATCC 204438); CBS: *T. aggressivum* TH2 (CBS 100525), *T. stromaticum* TST (CBS 101875); IMI: *T. atroviride* T11 (IMI 352941); *T. asperellum* T53 (IMI 20268); UNINA: *T. harzianum* TA6 (UNINA 96); ver **Tabla 3**]. Todas las secuencias ESTs están disponibles en la base de datos EMBL (www.ebi.ac.uk/embl/Access/index.html). Los respectivos números de acceso, así como el agrupamiento de ESTs individuales en cada *contig*, se pueden encontrar en los materiales suplementarios publicados por Samolski y col. (2009).

Las secuencias de los 9.129 transcritos anotados en el genoma de la cepa *T. reesei* QM 6a (que también quedaron representadas en el *microarray*) se obtuvieron de la dirección web <http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>.

7.2. Diseño y selección de sondas

El proceso de diseño y selección de sondas se llevó a cabo en estrecha colaboración con expertos bioinformáticos, utilizando algoritmos desarrollados *ad hoc*. La lista de sondas finalmente seleccionadas para ser incluidas en el "Trichochip" (384.659 en total) fue depositada en la base de

datos GEO (*Gene expression omnibus database*), disponible en la dirección web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/> (N.º acceso: GPL7702).

7.3. Fabricación del *microarray*

Las secuencias de las 384.659 sondas seleccionadas se remitieron a la compañía Roche-NimbleGen Inc., quienes efectuaron los correspondientes controles de calidad de las sondas y llevaron a cabo la fabricación del *microarray*. En la dirección web <http://www.nimblegen.com/company/technology/index.html> se encuentra información detallada sobre la tecnología de microespejos empleada para la síntesis de sondas *in situ* mediante fotolitografía.

7.4. Preparación de las muestras para la hibridación

Los "Trichohips" se hibridaron con ADNc obtenido a partir de micelio de *T. harizanum* CECT 2413 cultivado en dos etapas, según se describió en el apartado 4.5. En la segunda etapa, la pastilla de micelio obtenida en la etapa anterior se transfirió a medio de cultivo basal MS en las condiciones de cultivo de interés: en presencia de plantas de tomate (MS-P); quitina de centollón (*Paralomis granulosa*) (Idebio) al 1% (MS-Q); glucosa al 2% (MS-G); y medio basal MS como condición de referencia. Las plantas de tomate utilizadas en estos ensayos habían sido previamente cultivadas en turba según se describió en el apartado 5.2. Una vez retirada la turba adherida a las raíces mediante lavado de las mismas con agua destilada estéril, las raíces libres de turba se esterilizaron superficialmente sumergiéndolas consecutivamente en etanol al 70% (v/v) y en una solución de lejía al 50% (v/v). Posteriormente, se lavaron con abundante agua destilada estéril. Cada planta de tomate se colocó en un matraz de 250 mL con 100 mL de medio MS basal estéril y se sumergió hasta la altura del tallo. El medio se inoculó con la pastilla de micelio de *T. harizianum*.

Todos los cultivos de *T. harizanum* CECT 2413 se incubaron a 28°C y 90 rpm durante 9 h. Transcurrido este tiempo, el micelio adherido a la raíz se separó desprendiéndolo con ayuda de una pizeta con agua estéril, y se recogió junto con el micelio presente en el medio de cultivo mediante filtración. Los pasos seguidos para la filtración, lavados y conservación del micelio obtenido en todos los casos se describen en el apartado 4.5.

Se utilizaron 600 µg de ARN total (200 µg de cada réplica biológica de micelio, extraído según se describió en el apartado 6.5.1) para purificar ARNm utilizando el *kit* comercial Dynabeads® mRNA Purification Kit (Dyna® Biotech), basado en una tecnología de separación magnética. La purificación se realizó utilizando 200 µL de Dynabeads® según las especificaciones del fabricante. Con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de ARNm posible, se repitió la purificación reutilizando el ARN total residual, y cada paso de elución se efectuó dos veces consecutivas (utilizando el mismo eluido para concentrar la muestra). Con el fin de reducir al máximo la presencia de ARNr, el proceso de purificación de ARNm se realizó dos veces consecutivas con la misma muestra. La calidad del ARNm obtenido se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (apartado 6.7.2.1), y se cuantificó espectrofotométricamente (apartado 6.8.1). Mediante este procedimiento se consiguió aislar hasta 8 µg de ARNm, que se conservó a -80°C hasta su uso. El protocolo que se detalla a continuación se utilizó para concentrar muestras de ARNm cuando fue necesario:

1. Añadir 20 µg de glucógeno, 0,1 volumen de tampón acetato de sodio 3M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C).
2. Dejar precipitar toda la noche a -20°C.
3. Centrifugar a 16.000 g a 4°C durante 20 minutos, descartar el sobrenadante.
4. Lavar el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v).

5. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente durante unos 30 minutos.
6. Resuspender el precipitado en agua-DEPC y cuantificar por espectrofotometría (apartado 6.8.1). Conservar a -20°C hasta su uso.

A continuación, se efectuó la síntesis de ADNc de doble cadena partiendo de 5 µg de ARNm, utilizando el *kit* comercial Just cDNA™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Stratagene), según las instrucciones del fabricante. Con el fin de evitar sesgos en el ADNc sintetizado se emplearon oligonucleótidos aleatorios en lugar de un oligonucleótido poli-T. El ADNc obtenido se cuantificó mediante ensayo en placa con BrEt (apartado 6.8.3), y se conservó a -80°C hasta su uso. Finalmente, 2 µg de ADNc de cada muestra fueron enviados a NimbleGen Systems Inc. para su marcaje con oligonucleótidos aleatorios de 9 mer marcados con el fluoróforo Cy3, y posterior hibridación de los "Trichochips" utilizando un sistema MAUI (*Micro Array User Interface*, BioMicro® Systems).

7.5. Análisis bioinformático y estadístico de los datos obtenidos

Tras la hibridación de los "Trichochips", Roche-NimbleGen Inc. llevó a cabo la adquisición de datos (valores de intensidad de fluorescencia de las sondas) utilizando un escáner Axon GenePix 4000B asociado al programa NimbleScan 2.3. La información obtenida se remitió a nuestro laboratorio, donde se examinaron, procesaron y analizaron las imágenes y los valores de intensidad de fluorescencia de las sondas para la extracción de datos de expresión génica. El análisis se llevó a cabo utilizando el paquete bioinformático siggenes (<http://www.bioconductor.org>) con el programa R como lenguaje de programación y entorno para el análisis estadístico y gráfico (<http://www.r-project.org>).

8. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

8.1. Precipitación y diálisis de proteínas extracelulares de *Trichoderma* spp.

La precipitación de proteínas secretadas por *Trichoderma* spp. al medio de cultivo (sobrenadantes proteicos obtenidos como se describió en el apartado 4.6) se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Precipitar las proteínas añadiendo sulfato amónico sólido hasta alcanzar un 90% de saturación (60,3 g por cada 100 mL de solución).
2. Disolver completamente el sulfato amónico con un agitador magnético a 4°C.
3. Centrifugar a 12.000 g durante 20 min a 4°C.
4. Resuspender el precipitado de proteínas en el mínimo volumen posible de agua ultrapura.
5. Dializar a 4°C frente a 2 L de agua destilada para eliminar el exceso de sales utilizando membranas de diálisis de 12 kDa de límite de exclusión, preparadas según las instrucciones del fabricante (Sigma).
6. Mantener la diálisis durante 24 h en agitador magnético y cambiar el agua cada 8 h. Realizar un cambio adicional con tampón acético-acetato 50 mM pH 5,5.
7. Medir el volumen final de cada sobrenadante y calcular su concentración con respecto al volumen inicial.
8. Conservar los sobrenadantes concentrados a -20°C hasta su uso.

Tampón acético-acetato 1M pH 5,5: Acetato sódico 0,863 M, ácido acético 0,137 M.

8.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en solución se llevó a cabo por el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), según el procedimiento recomendado para microensayos (1-20 µg proteína/mL) que se indica a continuación:

1. Diluir la muestra en 800 µL de agua destilada.
2. Añadir 200 µL del reactivo, e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
3. Medir la absorbancia a 595 nm.
4. Determinar la cantidad de proteína utilizando una recta patrón obtenida simultáneamente con diluciones seriadas de seroalbúmina bovina (Sigma) a concentraciones conocidas (1-20 µg/mL).

8.3. Electroforesis 1-D en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de proteínas por tamaño se efectuó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Weber y Osborn, 1975) utilizando un sistema vertical de minigeles Mini-Protean® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad), según las instrucciones de la firma comercial.

Los geles de separación se prepararon a una concentración final de poliacrilamida del 12% (v/v), y los de empaquetamiento a una concentración de poliacrilamida del 4% (v/v). La polimerización de los geles se realizó a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio dispuestas para obtener geles de 0,75 mm de grosor. Las muestras de proteína se prepararon en tampón de carga (3:1) en un volumen final de 20 µL, y se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min.

La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis aplicando 200 V y 70 mA hasta que el colorante alcanzó la parte inferior del gel (45 min aproximadamente). Como marcadores de peso molecular se utilizaron proteínas de bajo peso molecular (Bio-Rad) (**Figura 55**).

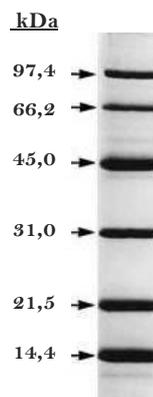
Gel de separación: agua ultrapura 2,175 mL, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 1,25 mL, SDS al 10% (p/v) 50 µL, solución de acrilamida:bis-acrilamida (29:1) al 40% (p/v) (AccuGel™ 29:1, National Diagnostics) 1,5 mL, APS al 10% (p/v) 25 µL, TEMED (Bio-Rad) 5 µL.

Gel de empaquetamiento: agua ultrapura 1,585 mL, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 0,625 mL, SDS al 10% (p/v) 25 µL, solución de acrilamida:bis-acrilamida (29:1) al 40% (p/v) 0,25 mL, APS al 10% (p/v) 12,5 µL, TEMED 2,5 µL.

Tampón de carga: Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, glicerol 40% (v/v), SDS 8% (p/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v), 2-mercaptoetanol 20% (v/v).

Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v).

Figura 55. Estándar de proteínas de bajo peso molecular (Bio-Rad) utilizado para SDS-PAGE. Las bandas observadas corresponden a las siguientes proteínas: fosforilasa B de músculo de conejo (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina de gallina (45 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31 kDa), inhibidor de tripsinógeno de semilla de soja (21,5 kDa) y lisozima de huevo de gallina (14,4 kDa).



8.4. Tinción con azul de Coomassie

Para la visualización de proteínas después de SDS-PAGE, los geles se sumergieron en solución de tinte a temperatura ambiente manteniéndolos en agitación durante al menos 1 h. Posteriormente, se destiñeron por lavados sucesivos en solución de lavado. Finalmente, se fijaron y conservaron en ácido acético al 7% (v/v).

Solución de tinte: Azul de Coomassie R-250 (Sigma) 0,25% (p/v), ácido acético 10% (v/v), etanol 45% (v/v).

Solución de lavado: Ácido acético 10% (v/v), etanol 45% (v/v).

8.5. Transferencia de proteínas a membranas e inmunodetección (*Western blot*)

El análisis de proteínas mediante *Western-blot* se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Separar las proteínas mediante SDS-PAGE como se describió en el apartado 8.3. Incluir en un carril del gel un marcador de peso molecular preteñido (Bio-Rad).
2. Una vez terminada la electroforesis, equilibrar el gel en tampón de transferencia durante 10-20 min.
3. Cortar la membrana de fluoruro de polivinilideno (Immobilon™-P, Millipore) del tamaño del gel y activarla sumergiéndola 15 seg en metanol, 2 min en agua destilada, y equilibrarla en tampón de transferencia durante al menos 5 min.
4. Montar el sistema húmedo de electrotransferencia utilizando una Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. En la **Figura 56** se representa el montaje del sistema de transferencia.
5. Transferir durante 1 h a 100 V (6-8 V/cm de separación de electrodos) en tampón de transferencia a 4°C con un agitador magnético.
6. Desmontar el sistema y comprobar que la transferencia ha sido eficiente mediante visualización del marcador preteñido en la membrana.
7. Sumergir la membrana en metanol durante 10 seg y secarla al aire sobre un papel de filtro (se puede conservar a 4°C en seco hasta su uso).
8. Incubar la membrana en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante al menos 45 min en agitación suave.
9. Descartar el tampón e incubar con el anticuerpo primario a la dilución adecuada en tampón de bloqueo fresco.
10. Incubar a 4°C durante toda la noche con agitación suave.
11. Lavar la membrana tres veces con tampón de lavado a temperatura ambiente durante 10 min cada vez.
12. Añadir el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG peroxidase conjugate, Sigma) a la dilución adecuada en tampón de bloqueo fresco. Incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.
13. Lavar tres veces con tampón de lavado a temperatura ambiente durante 10 min cada vez.
14. Revelar utilizando el *kit* comercial Pierce® ECL Western Blotting Detection Kit (Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante.
15. Exponer la membrana directamente en un equipo de captura quimioluminiscente Fujifilm LAS-1000.

Tampón de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10% (v/v).

Tampón de lavado: Tween® 20 0,1% (v/v) en PBS 1x.

Tampón de bloqueo: Leche desnatada en polvo 5% (p/v) en tampón de lavado. Prepararlo al momento de usar.

Tampón PBS 10x: Tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,5, NaCl 1,5 M.

Tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,5: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 80 mM.

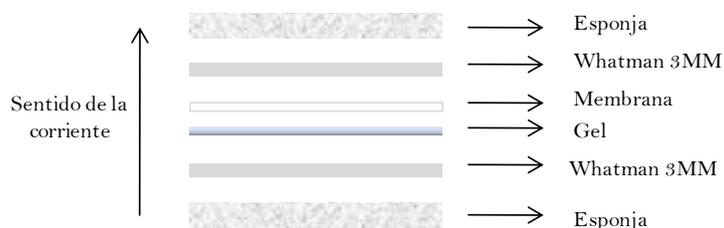


Figura 56. Esquema del sistema húmedo de electrotransferencia de proteínas a membranas (*Western blot*).

8.6. Reutilización de membranas

El protocolo seguido para la reutilización de membranas en ensayos *Western-blot* se indica a continuación:

1. Incubar la membrana en tampón de deshibridación a 50°C durante 30 min con agitación suave.
2. Lavar la membrana dos veces con tampón de lavado a temperatura ambiente durante 10 min cada vez.
3. Bloquear la membrana y continuar con la inmunodetección, o conservarla a 4°C humedecida en tampón de lavado.

Tampón de deshibridación: 2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2% (p/v), Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8.

8.7. Obtención del anticuerpo policlonal anti-ASP1

El proceso de obtención del anticuerpo policlonal anti-ASP1 (inmunización de conejos, obtención del antisuero y purificación del anticuerpo) fue realizado por la empresa ImmunoStep S. L (Salamanca, España). Con el fin de obtener cantidad suficiente de la proteína ASP1 de *T. harzianum* CECT 2413 para el proceso de inmunización (3 mg de proteína) se realizaron cultivos de la cepa ASP1T1 (cepa de *T. harzianum* que sobreexpresa *asp1*) en medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v) (según se describió en el apartado 4.6). Posteriormente, los sobrenadantes de cultivo se concentraron y se dializaron según se describe en el apartado 8.1. Finalmente, los concentrados proteicos se sometieron a SDS-PAGE (apartado 8.3) y electroelución (apartado 8.8) para purificar la proteína ASP1.

8.8. Electroelución de proteínas a partir de geles de poliacrilamida

El protocolo seguido para la electroelución de la proteína ASP1 a partir de geles de poliacrilamida se detalla a continuación:

1. Someter a SDS-PAGE (apartado 8.3) la muestra proteica, utilizando el sistema de geles de formato largo Protean® II xi Cell (Bio-Rad).
2. Para localizar la proteína de interés, aislar con la ayuda de un bisturí uno de los carriles del gel y teñir con azul de Coomassie (apartado 8.4).
3. Recolocar el carril teñido en el gel de procedencia, localizar la altura a la que debe encontrarse la proteína de interés en el resto de carriles y cortar una tira horizontal a la altura correspondiente con ayuda de un bisturí.
4. Introducir el fragmento de gel cortado (sin teñir) con la proteína de interés en una membrana de diálisis de 12 kDa de límite de exclusión (Sigma), conteniendo tampón de electroforesis. La membrana de diálisis se preparó previamente según las instrucciones del fabricante.
5. Colocar la membrana de diálisis con el fragmento de gel dentro, en una cubeta de electroforesis horizontal con tampón de electroforesis, colocándola de manera tal que quede transversal a la dirección de la corriente eléctrica.
6. Dejar electroeluyendo a 4°C durante toda la noche a 20 mA.
7. Finalizada la electroelución, retirar la tira de gel del interior de la membrana de diálisis y teñir con azul de Coomassie (apartado 8.4) para confirmar una completa electroelución de la proteína.
8. Cerrar la membrana conteniendo la proteína electroeluida y dializar con varios cambios frente a agua (como se describió en el apartado 8.1).
9. Transferir la solución proteica a un tubo Corex®, congelar a -80°C y liofilizar.
10. Resuspender en tampón PBS 1x (apartado 8.5) y ajustar hasta la concentración deseada.
11. Confirmar la pureza de la proteína electroeluida mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (apartados 8.3 y 8.4, respectivamente).
12. Determinar la cantidad total de proteína aislada por el método de Bradford (apartado 8.2).

8.9. Ensayos de actividad proteolítica

Para determinar la actividad de la aspartil-proteasa ASP1 de *T. harzianum* CECT 2413, se efectuaron ensayos enzimáticos en solución basados en el método descrito por Folin y Ciocalteu (1929), con algunas modificaciones. El ensayo se fundamenta en la liberación del aminoácido tirosina como producto de la degradación del sustrato (caseína) por la actividad proteolítica de la enzima ensayada. La tirosina liberada reacciona con el reactivo Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma) produciendo un cromóforo azul, que puede cuantificarse espectrofotométricamente.

En este trabajo, los volúmenes del ensayo se adaptaron a escala de microensayo, y se determinaron las condiciones óptimas de pH (2,5) y temperatura (50°C) de la proteasa ASP1. A continuación, se describe el ensayo de actividad proteolítica seguido:

1. Mezclar 500 µL de sustrato atemperado a 50°C* [caseína al 1% (p/v) pH 2,5** preparada en ácido láctico 50 mM] con 100 µL de solución enzimática. Incluir una muestra control sin enzima.
2. Incubar a 50°C durante 10 min.
3. Añadir 500 µL de ácido tricloroacético 0,11 M para detener la reacción y centrifugar a 13.000 g durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Recoger 200 µL de sobrenadante y revelar añadiendo 500 µL de carbonato sódico 0,5 M y 100 µL del reactivo Folin & Ciocalteu.

5. Incubar a 37°C durante 30 min.
6. Centrifugar a 13.000 g durante 5 min a temperatura ambiente.
7. Leer la absorbancia a 660 nm.
8. Determinar la actividad proteolítica de cada muestra utilizando una recta patrón obtenida a partir de reacciones enzimáticas simuladas con cantidades conocidas de L-tirosina (5,5-220 nmoles).

Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que produce la liberación de 1 µg de L-tirosina por minuto en las condiciones ensayadas. Para obtener la actividad proteolítica en U/mL se realizó el siguiente cálculo:

$$U/ml = \frac{\text{L-tirosina liberada } (\mu\text{moles}) \times \text{vol total del ensayo (1,1 ml)}}{\text{vol de enzima (0,1 ml)} \times \text{tiempo del ensayo (10 min)} \times \text{vol determinación colorimétrica (0,8 ml)}}$$

* La temperatura óptima de ASP1 se determinó utilizando un rango de temperaturas de 30 a 70°C.

** El pH óptimo de ASP1 se determinó utilizando un rango de pHs de 1,5 a 7,0. El sustrato se preparó en los siguientes sistemas de tampones: ácido láctico 50 mM (pH 1,5-4,0) o tampón acético-acetato 50 mM (pH 5,0-7,0).

9. OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES DE *T. harzianum* CECT 2413

Para la obtención de cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan el gen *asp1* o que tienen silenciada su expresión se construyeron los plásmidos recombinantes que se recogen en la **Tabla 9**. Una vez obtenidos los plásmidos se procedió a introducirlos por transformación de protoplastos (apartado 6.14.2) en *T. harzianum* CECT 2413.

Tabla 9. Plásmidos construidos para la obtención de transformantes de *T. harzianum* CECT 2413

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	UTILIDAD
pAN52-1-<i>asp1</i> 6.890 pb	Plásmido generado al insertar la ORF del gen <i>asp1</i> (1.161 pb) en el vector plasmídico pAN52 (Tabla 7)	Plásmido intermediario en el proceso de construcción del plásmido pJL43b1- <i>asp1</i>
pJL43b1-<i>asp1</i> 8.724 pb	Plásmido generado al subclonar el casete de expresión Pgpda: <i>asp1</i> en el vector plasmídico pJL43b1 (Tabla 7)	Transformación de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 para expresar constitutivamente el gen <i>asp1</i>
pSIL-<i>asp1</i> 6.060 pb	Plásmido generado al insertar dos fragmentos de 400 pb del gen <i>asp1</i> (en orientaciones invertidas y separados por un intrón) en el vector plasmídico pSIL (Tabla 7)	Silenciamiento de la expresión del gen <i>asp1</i> en <i>T. harzianum</i> CECT 2413, junto con el plásmido pAN7-1 (Tabla 7) como portador del gen marcador de selección <i>hph</i>

9.1. Construcción del plásmido pJL43b1-*asp1*

Este plásmido se utilizó para sobreexpresar el gen *asp1* en *T. harzianum* CECT 2413 bajo el dominio del promotor constitutivo PgpdA (promotor del gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa de *A. nidulans*). Para su construcción (**Figura 57**), inicialmente se amplificó por PCR la ORF del gen *asp1* con la enzima *Pfu* polimerasa (Biotools) y los oligonucleótidos 6281Nf y 6281Nr (**Tabla 8**), los cuales incluyen en su secuencia dianas para la enzima de restricción *NcoI* (CCATGG) y dos nucleótidos adicionales (TT) para permitir la clonación de *asp1* en fase. El fragmento amplificado se digirió con la enzima *NcoI* y se ligó al vector pAN52-1 (previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado), dando lugar al plásmido pAN52-1-*asp1*. Posteriormente, a partir de este plásmido, se amplificó por PCR el casete de expresión PgpdA:*asp1*, de 4.230 pb, utilizando el sistema Triple Master® PCR System (Eppendorf) y los oligonucleótidos pAN52-gpdH-5' y pAN52-trpH-3', que generan dianas para la enzima *HindIII* (**Tabla 8**). El producto amplificado se digirió con *HindIII* y se subclonó en el vector pJL43b1 (digerido con la misma enzima de restricción y desfosforilado), dando lugar al vector pJL43b1-*asp1*, de 8.724 pb, que se utilizó para transformar protoplastos de *T. harzianum* CECT 2413.

9.2. Construcción del plásmido pSIL-*asp1*

Este plásmido se utilizó para silenciar la expresión del gen *asp1* en *T. harzianum* CECT 2413. Se construyó a partir del vector pSIL (Sousa, 2004) mediante la inserción, en orientaciones invertidas, de un fragmento de 400 pb del gen *asp1* de *T. harzianum* CECT 2413 (correspondiente al sitio activo de la proteína ASP1), quedando cada fragmento separado por un intrón (**Figura 58**). Cada uno de los fragmentos fueron amplificados por PCR con la enzima *Pfu* polimerasa (Biotools) a partir de la ORF del gen *asp1* con oligonucleótidos específicos que incluyen en su secuencia dianas para las enzimas de restricción apropiadas. La amplificación del fragmento en orientación "sentido" se llevó a cabo con los oligonucleótidos pSIL6281-I y pSIL6281-IR, que incluyen dianas para *XbaI* y *BamHI*, respectivamente (**Tabla 8**). Para la amplificación del fragmento en orientación "antisentido" se utilizaron los oligonucleótidos pSIL6281-f2 y pSIL6281-r2, que incluyen dianas *XhoI* y *EcoRI*, respectivamente (**Tabla 8**). Cada fragmento, debidamente digerido, se clonó en pasos sucesivos en el vector PSIL según se ilustra en la **Figura 58**. El plásmido resultante, pSIL-*asp1*, se utilizó junto con pAN7-1 (que contiene al gen *hph* que confiere resistencia a higromicina B; **Tabla 7**) para cotransformar protoplastos de *T. harzianum* CECT 2413.

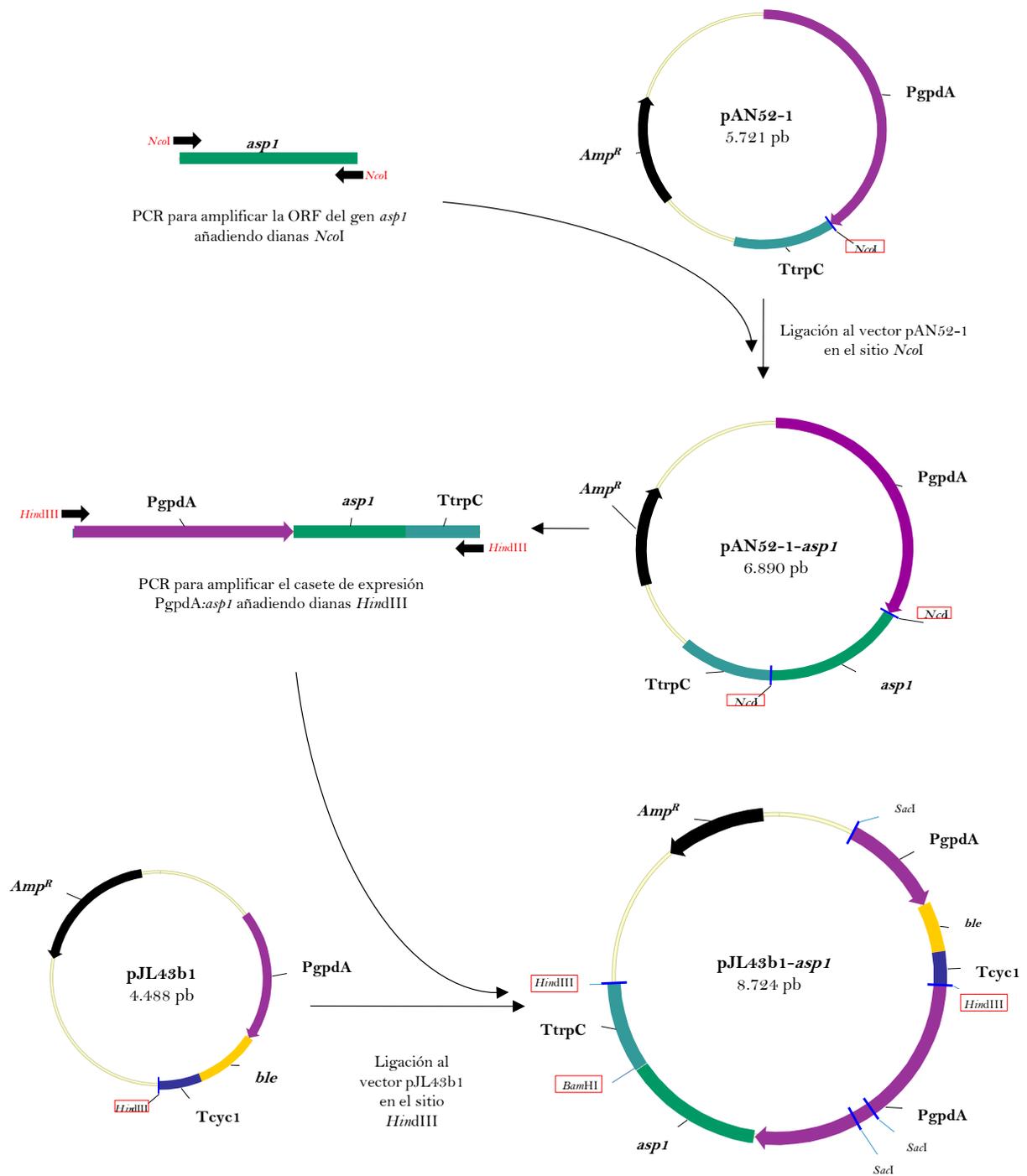


Figura 57. Esquema del proceso de construcción del plásmido pJL43b1-*asp1*.

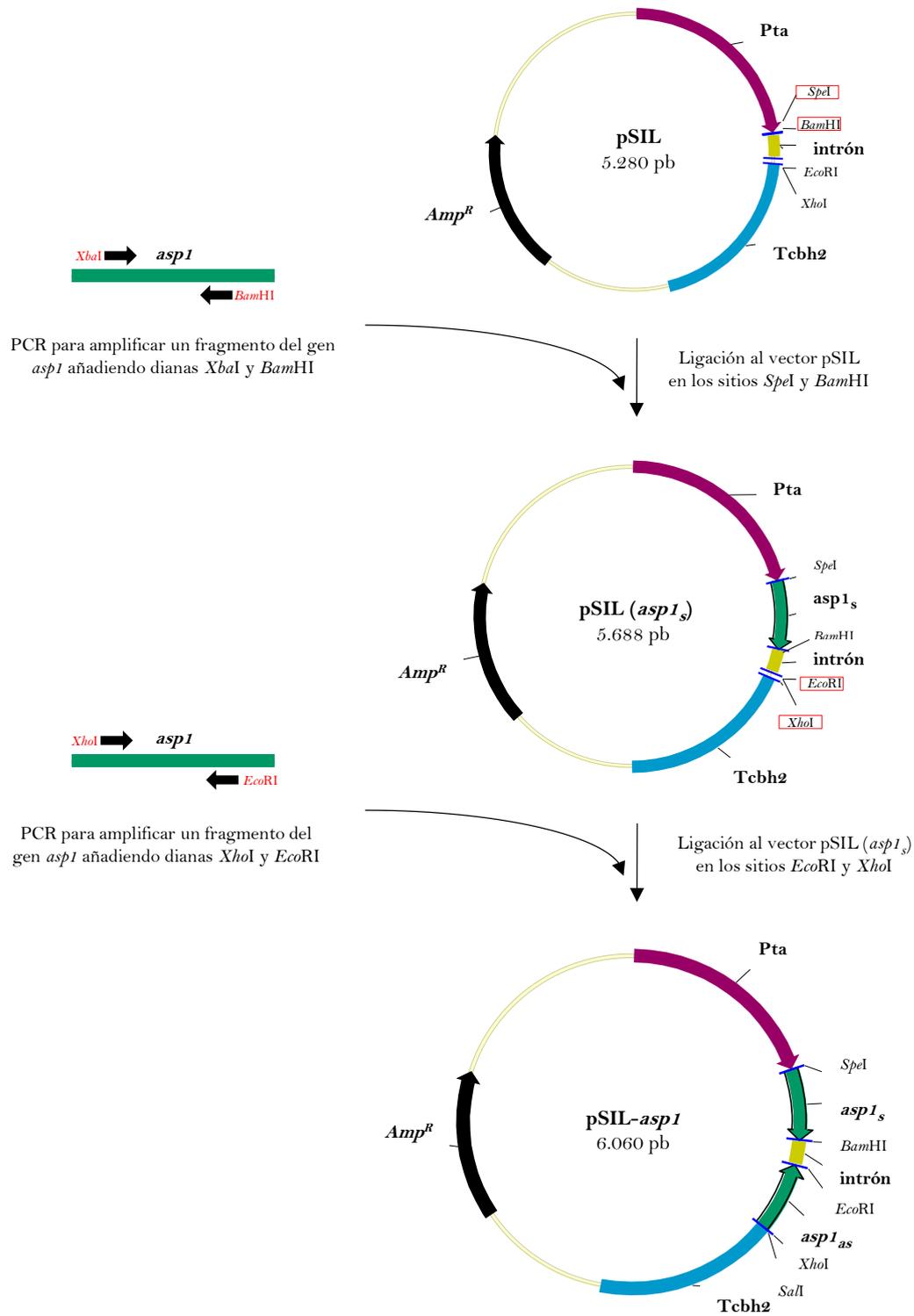


Figura 58. Esquema del proceso de construcción del plásmido pSIL-*asp1*.

10. ENSAYOS PARA LA CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *qid74* Y *asp1* DE *T. harzianum* CECT 2413

10.1. Ensayos de hidrofobicidad

10.1.1. Hidrofobicidad superficial

Para evaluar la hidrofobicidad de las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) o las cepas que carecen de dicho gen (QID74Δ1 y QID74Δ2), se tomó como referencia el método descrito por Viterbo y Chet (2006) y Djonović y col. (2007). Para ello, se colocó una gota de 100 µL de agua ultrapura estéril sobre la superficie del micelio del hongo previamente cultivado en medio PDA durante dos días (sin esporular y sin hifas aéreas). Después de 48 h de incubación a 28°C y en oscuridad, se observó si las gotas se mantenían en la superficie del hongo (micelio hidrofóbico) o si habían sido absorbidas (micelio hidrofílico). Cada cepa se evaluó por triplicado y el ensayo se repitió dos veces.

10.1.2. Ruptura de la interfase líquido-aire

Para evaluar el crecimiento en la interfase líquido-aire de las hifas de las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) o las cepas que carecen de dicho gen (QID74Δ1 y QID74Δ2), se tomaron como referencia los ensayos descritos por Di Pietro y col. (2001) y Mendoza-Mendoza y col. (2007). Para ello, se depositaron gotas de 100 µL de medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v), conteniendo 5×10^6 esporas fúngicas/mL (recogidas según se describe en el apartado 4.1), en el interior de una placa Petri vacía de 5 cm de diámetro. Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad con una humedad relativa del 100% durante 96 h. A lo largo del ensayo se evaluó la capacidad de las hifas de romper la tensión superficial de la gota, emergiendo y creciendo sobre ella. Cada cepa se evaluó por triplicado y el ensayo se repitió dos veces.

10.2. Ensayos de resistencia a compuestos antifúngicos

10.2.1. Resistencia a enzimas líticas: autoprotección celular

Para evaluar la resistencia de las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) o las cepas que carecen de dicho gen (QID74Δ1 y QID74Δ2) frente a enzimas líticas secretadas por *T. harzianum* CECT 2413 (autoprotección celular), se recogieron sobrenadantes de cultivo de esta cepa crecida en medio líquido MM en presencia de paredes celulares del hongo *R. solani* al 1% (p/v) (apartado 4.7) o de paredes celulares de raíces de pepino o tomate (apartado 5.5). Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 realizados en dos etapas, según se describió en el apartado 4.6. Posteriormente, las proteínas presentes en los sobrenadantes se precipitaron y dializaron según se describió en el apartado 8.1.

Los ensayos de resistencia se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos (Falcon) depositando en cada pocillo 36 µL del sobrenadante proteico concentrado, 4 µL de medio PDB 5x y 20 µL de una suspensión de 800 esporas de *T. harzianum* correspondiente (esporas recogidas según se describió en el apartado 4.1). La concentración final de sobrenadante por pocillo ensayada fue 5x. Como control negativo se utilizó agua ultrapura estéril en lugar del sobrenadante. Las placas se incubaron a 22°C en oscuridad durante 12 h, y se evaluó la inhibición de la germinación y la elongación del tubo germinativo con ayuda de un microscopio invertido (Axiovert 25, Zeiss). Las imágenes se capturaron con el programa informático RS image v. 1.9.2 (Roper Scientific, Inc.). Cada cepa se evaluó por triplicado y el ensayo se realizó dos veces.

10.2.2. Resistencia a compuestos tóxicos secretados por la planta

Para evaluar la resistencia de las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) o las cepas que carecen de dicho gen (QID74Δ1 y QID74Δ2) frente a compuestos tóxicos secretados por las plantas, se siguió el mismo tipo de ensayo descrito en el apartado anterior pero utilizando exudados de raíces de plantas de pepino (5x) o H₂O₂ (4 mM) en lugar de los sobrenadantes proteicos. Los exudados fueron obtenidos tras 28 días de crecimiento de plantas de pepino (var. Marketmore) en cultivo hidropónico en medio PGM (según se describió en el apartado 5.4). Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se recogió, se concentró mediante liofilización y se esterilizó mediante filtración. Cada cepa de *Trichoderma* se evaluó por triplicado y el ensayo se realizó dos veces.

10.2.3. Resistencia a fungicidas químicos

Para evaluar la resistencia de las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) o las cepas que carecen de dicho gen (QID74Δ1 y QID74Δ2) frente a los compuestos antifúngicos terbinafina y miconazol, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) –mínima concentración capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo diana un 99,9%– siguiendo el procedimiento descrito por Cardoza y col. (2006b). Para ello, se prepararon diluciones seriadas del compuesto antifúngico a ensayar en un rango de concentración de 7,8-250 µg/mL.

Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos (Falcon) depositando en cada pocillo 50 µL de la dilución del compuesto antifúngico, 75 µL de medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v) y 125 µL de una suspensión de 2x10⁵ esporas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (esporas recogidas según se describió en el apartado 4.1). Como control negativo se utilizó agua ultrapura estéril en lugar del compuesto antifúngico. Después de 72 h de incubación a 28°C en oscuridad, se determinó la CMI con ayuda de un microscopio invertido (Axiovert 25, Zeiss). Las imágenes se capturaron con el programa informático RS Image v. 1.9.2 (Roper Scientific, Inc.). Cada cepa se evaluó por triplicado y el ensayo se repitió dos veces.

10.3. Ensayos de crecimiento en medio sólido

Para medir el crecimiento de las distintas cepas de *T. harzianum* se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA. Para ello, se colocó en el centro de cada placa un cilindro de agar (de 5 mm de diámetro) procedente de un cultivo fúngico anterior en crecimiento activo en PDA. Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad y la evaluación del crecimiento radial se llevó a cabo cada 24 h midiendo el diámetro de las colonias (la media de dos diámetros perpendiculares). Adicionalmente, se examinó la producción de hifas aéreas, así como el color y morfología de la colonia. Cada cepa se evaluó por triplicado y el ensayo se repitió dos veces.

10.4. Ensayos de actividad antifúngica de *T. harzianum*

10.4.1. Ensayos *in vivo*: enfrentamiento en medio sólido

La cepa silvestre y las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *asp1* (ASP1T1 y ASP1T2) o que silencian dicho gen (ASP1Sil1 y ASP1Sil2) se enfrentaron a los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *C. acutatum* y *R. solani* en cultivos duales en placas Petri de 9 cm con medio PDA. Para ello, las placas se inocularon con dos cilindros de agar (de 5 mm de diámetro) procedentes de cultivos fúngicos anteriores en crecimiento activo en medio PDA, de manera que los inóculos de los dos hongos enfrentados (*T. harzianum* vs. hongo fitopatógeno) quedaran situados en extremos opuestos de la placa, con una separación de 6 cm entre sí (debido al crecimiento lento de *C. acutatum*, este hongo se inoculó con 7 días de antelación). Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad durante 15

días. A lo largo del ensayo se evaluó el crecimiento y comportamiento de cada hongo. Cada uno de los enfrentamientos se llevó a cabo por triplicado y el ensayo se realizó dos veces.

10.4.2. Ensayos *in vitro*: inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en medio líquido

Para evaluar la inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *B. cinerea* por acción de proteínas secretadas por las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *asp1* (ASP1T1 y ASP1T2), se recogieron sobrenadantes de cultivo de cada cepa de *Trichoderma* crecida durante 48 h en medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v). Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de cultivos realizados en dos etapas, según se describió en el apartado 4.6. Posteriormente las proteínas presentes en los sobrenadantes se precipitaron y dializaron según se describió en el apartado 8.1

Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos (Falcon) depositando en cada pocillo 48 μ L del sobrenadante de la cepa de *T. harzianum* correspondiente, 4 μ L de medio PDB 5x y 8 μ L de una suspensión de 800 esporas de *B. cinerea* (recogidas según se describió en el apartado 4.1). Se ensayaron diferentes concentraciones finales de sobrenadante por pocillo: 2x, 10x y 20x. Como control negativo se utilizó agua ultrapura estéril en lugar del sobrenadante, y como controles adicionales se incluyeron los mismos sobrenadantes hervidos durante 10 min a 100°C. Las placas se incubaron a 22°C en oscuridad durante 12 h, y se evaluó la inhibición de la germinación de las esporas y la elongación del tubo germinativo con ayuda de un microscopio invertido (Axiovert 25, Zeiss). Las imágenes se capturaron con el programa informático RS image v. 1.9.2 (Roper Scientific, Inc.). Cada condición se evaluó por triplicado y el ensayo se realizó dos veces.

10.5. Ensayos de interacción *Trichoderma*-planta

10.5.1. Semillas pildoradas con esporas de *T. harzianum*

En una placa Petri de 5 cm de diámetro se colocaron semillas esterilizadas superficialmente de tomate o de pepino y se cubrieron con 1 mL de una suspensión de esporas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (2×10^8 esporas totales), recogidas según se describió en el apartado 4.1. Las placas se mantuvieron abiertas dentro de una cámara de flujo laminar hasta que las semillas estuvieron completamente secas, quedando de este modo recubiertas con las esporas. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril en lugar de la suspensión de esporas. Una vez pildoradas, las semillas se utilizaron inmediatamente para los ensayos correspondientes, bien en turba (apartado 5.2) o en cajas Magenta® GA-7 (Sigma) con medio semisólido MS (apartado 5.3).

10.5.2. Cultivos de *Trichoderma*-planta en medio semisólido MS

El cultivo de plántulas de tomate en presencia de *T. harzianum* se realizó tomando como referencia el sistema de interacción descrito por Contreras-Cornejo y col. (2009). Para ello, se utilizaron plántulas crecidas durante 5 días en placas Petri con medio MS semisólido según se describió en el apartado 5.3. Cada placa se inoculó con una suspensión de esporas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (recogidas según se describió en el apartado 4.1), depositando 5 μ L de la suspensión (1×10^6 esporas totales) en el extremo opuesto de la placa, a 5 cm aproximadamente del ápice de las raíces. Las placas inoculadas se sellaron y se incubaron en fitotrón bajo condiciones controladas (23°C, 16 h de luz y 75% de humedad relativa) durante el tiempo de interacción deseado.

10.5.3. Cultivos de *Trichoderma*-planta en medio líquido PGM

10.5.3.1. Con micelio de *T. harzianum*

El cultivo de plántulas de pepino en presencia de micelio de *T. harzianum* se llevó a cabo utilizando plántulas crecidas durante 9 días en cajas Phytatray™ II (Sigma) o en cajas Magenta® GA-7 (Sigma) con medio líquido PGM según se describió en el apartado 5.4. Posteriormente, el medio de cultivo se inoculó con una pastilla de micelio de la cepa de *T. harzianum* correspondiente crecida durante 48 h en MM con glucosa al 2% (p/v) (la pastilla se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito para producción de biomasa en el apartado 4.5). Las cajas se mantuvieron en agitación a 90 rpm y 28°C durante el tiempo de interacción deseado. Cuando fue necesario analizar la expresión de genes de *T. harzianum*, el micelio adherido a la raíz se separó desprendiéndolo con ayuda de una pizeta con agua estéril, y se recogió junto con el micelio presente en el medio de cultivo mediante filtración. Los pasos seguidos para la filtración, lavados y conservación del micelio obtenido se describen en el apartado 4.5.

10.5.3.2. Con germínulas de *T. harzianum*

Para el cultivo de plántulas de pepino en presencia de germínulas de *T. harzianum*, se utilizaron plántulas crecidas durante 9 días en cajas Phytatray™ II (Sigma) o en cajas Magenta® GA-7 (Sigma) con medio líquido PGM según se describió en el apartado 5.4. Posteriormente, el medio se inoculó con germínulas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente a una concentración final de $1,5 \times 10^5$ germínulas/mL (recogidas según se describió en el apartado 4.3). Las cajas se mantuvieron en agitación suave dentro de un fitotrón bajo condiciones controladas (23°C, 16 h de luz y 75% de humedad relativa) durante el tiempo de interacción deseado.

10.5.4. Análisis de germinación de semillas y crecimiento de plantas de tomate y pepino

Para evaluar el efecto de las distintas cepas de *T. harzianum* sobre la germinación de semillas de tomate (var. Marmande) y el crecimiento aéreo de las plantas, se utilizaron semillas de tomate pildoradas con esporas de la cepa correspondiente (apartado 10.5.1), que posteriormente se sembraron en medio MS 0,2x semisólido (según se describió en el apartado 5.3). A los 20 días se determinó el porcentaje de germinación de las semillas y la longitud de la parte aérea de las plántulas. Cada condición se evaluó por duplicado y el ensayo se realizó dos veces.

Para evaluar el efecto de las distintas cepas de *T. harzianum* sobre la arquitectura del sistema radical de plántulas de pepino (var. Kfir), se utilizaron plántulas cultivadas en cajas Phytatray™ II (Sigma) con medio líquido PGM inoculado con germínulas de la cepa correspondiente (según se describió en el apartado 10.5.3.2). Como control negativo se utilizó agua estéril en lugar de germínulas. A 7 dpi se determinó la longitud de la raíz principal y se inspeccionó la morfología del sistema radical. Cada condición se evaluó por duplicado y el ensayo se realizó dos veces.

Para evaluar el efecto de las distintas cepas de *T. harzianum* sobre la arquitectura del sistema radical de plántulas de tomate (var. Marmande) se utilizaron plántulas cultivadas en placas Petri con medio semisólido MS inoculado con una suspensión de esporas de la cepa correspondiente (según se describió en el apartado 10.5.2). Como control negativo se utilizó agua estéril en lugar de esporas. A 7 dpi se determinó la longitud tanto de la raíz principal como de las secundarias. Cada condición se evaluó por duplicado y el ensayo se realizó dos veces.

En los ensayos llevados a cabo en invernadero se utilizaron semillas de tomate (var. Marmande) o de pepino (var. Marketmore 70) pildoradas con esporas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (apartado 10.5.1), que posteriormente se sembraron en alvéolos con turba estéril

(según se describió en el apartado 5.2). A los 28 días, se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas y el crecimiento de 30 plantas por condición, midiendo la longitud y peso seco de la parte aérea (el tejido vegetal se secó a 65°C durante 72 h).

10.5.5. Cuantificación de nutrientes en hojas de pepino y tomate

Para evaluar el efecto de las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) sobre el estatus nutricional de plantas de tomate y pepino, se determinó la concentración de distintos nutrientes presentes en la parte aérea de las mismas. Los siguientes elementos se analizaron mediante ICP-OES (*Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*): B, Ca, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, P y Zn; y la concentración de C total (orgánico e inorgánico) y N mediante un analizador elemental. Estos análisis fueron llevados a cabo por el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC (Murcia).

Los ensayos se realizaron en invernadero con semillas de tomate (var. Marmande) o de pepino (var. Marketmore 70) pildoradas con esporas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (apartado 10.5.1), estas se sembraron en alvéolos con turba estéril (según se describió en el apartado 5.2). A los 28 días se recogió la parte aérea de la planta tomando aleatoriamente 3 grupos de 10 plantas por condición. Cada grupo se consideró como una muestra aleatoria. El tejido vegetal se secó durante 72 h a 65°C, se pulverizó con ayuda de un molinillo y se envió para analizar por duplicado (0,5 g por muestra).

10.5.6. Adherencia y colonización de raíces en plántulas de pepino

Para evaluar la capacidad de las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan *qid74* (QID74T1 y QID74T2) o las cepas que carecen de dicho gen (QID74Δ1 y QID74Δ2) de adherirse a las raíces de plántulas de pepino (var. Kfir), se utilizaron plántulas cultivadas en cajas Phytatray™ II (Sigma) con medio líquido PGM inoculado con micelio de la cepa correspondiente (según se describió en el apartado 10.5.3.1). La adherencia del micelio a la superficie de las raíces se evaluó macroscópicamente a diferentes hpi. Cada cepa se evaluó por duplicado y el ensayo se realizó dos veces.

Para evaluar la capacidad de las distintas cepas de *T. harzianum* de penetrar y colonizar raíces de plántulas de pepino (var. Kfir), se utilizaron plántulas cultivadas en cajas Phytatray™ II (Sigma) con medio líquido PGM inoculado con germínulas de la cepa correspondiente (según se describió en el apartado 10.5.3.2). Posteriormente, se cuantificó la colonización de las raíces de las plántulas por parte de cada cepa de *T. harzianum* mediante PCR a tiempo real (apartado 6.11.2). Para ello, se recogieron raíces a diferentes hpi, agrupándose las raíces de 6 plantas por cada tratamiento, cada uno de los cuales se realizó por duplicado. Las raíces se esterilizaron superficialmente con lejía al 20% (v/v) durante 1 min con objeto de eliminar el micelio adherido a la superficie de estas y, así, garantizar la extracción únicamente del ADN fúngico en el interior de la raíz. A continuación, se lavaron extensivamente con agua destilada estéril y se conservaron a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN (apartado 6.4.3).

En el caso de cepas de *Trichoderma* marcadas con la proteína GFP se evaluó la capacidad de colonización mediante microscopía confocal (apartado 11).

10.5.7. Inducción de respuestas de defensa en plantas a nivel local y sistémico

10.5.7.1. Acumulación de fitoalexinas (autofluorescencia) y fitotoxicidad a nivel local

Para evaluar si las proteínas secretadas por la cepa silvestre y la cepa ASP1T1 de *T. harzianum* que sobreexpresa *asp1* inducían la acumulación de fitoalexinas (compuestos fenólicos de

defensa que presentan autofluorescencia) y producían fitotoxicidad en las plantas, se tomó como referencia el método descrito por Pazzagli y col. (1999). Para ello, se recogieron sobrenadantes de cultivo de cada cepa crecida durante 48 h en medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v). Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de cultivos realizados en dos etapas, según se describió en el apartado 4.6. Posteriormente, las proteínas presentes en los sobrenadantes se precipitaron y dializaron según se describió en el apartado 8.1. Por otro lado, se recogieron hojas cotiledonares de plántulas de pepino (var. Marketmore 70) cultivadas en turba durante 10 días bajo condiciones controladas de crecimiento en invernadero (apartado 5.2).

Los ensayos se llevaron a cabo aplicando sobre cada hoja cotiledonar 10 μL del sobrenadante proteico concentrado (120x) de la cepa correspondiente realizando una ligera punción en la nervadura central del haz. Como control negativo se aplicó agua ultrapura estéril en lugar del sobrenadante, y como control positivo se aplicaron 25 nmoles de SA. Como controles adicionales se incluyeron los mismos sobrenadantes hervidos durante 10 min. Las hojas cotiledonares tratadas se colocaron sobre papel de filtro húmedo dentro cajas Phytatray™ II (Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente. La autofluorescencia alrededor de la zona de aplicación se evaluó tras 24 hpi en un transiluminador con luz ultravioleta (FirstLight™ UV Illuminator, UVP) y las imágenes se captaron con ayuda de un sistema acoplado a él (BioDoc-It™ Imaging System, UVP). También se evaluó la aparición de lesiones necróticas así como su tamaño. Se trataron 4 hojas cotiledonares por cada condición y el ensayo se realizó dos veces.

10.5.7.2. Expresión de genes de defensa en planta

Para evaluar si la cepa silvestre y la cepa ASP1T1 de *T. harzianum* que sobreexpresa *asp1* o las proteínas secretadas por ellas eran capaces de inducir respuestas de defensa sistémica en plántulas de pepino (var. Kfir), se analizó la expresión de genes marcadores de defensa en hojas cotiledonares tras el tratamiento de las raíces de las plantas con germínulas de las cepas de *T. harzianum* correspondientes (ensayos *in vivo*) o con sobrenadantes de cultivo de dichas cepas (ensayos *in vitro*).

10.5.7.2.1. *In vitro*

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo tomando como referencia el método descrito por Djonović y col. (2006). Para ello, se recogieron sobrenadantes de las cepas de *T. harzianum* correspondientes crecidas durante 48 h en medio MM suplementado con glucosa al 2% (p/v). Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de cultivos realizados en dos etapas, según se describió en el apartado 4.6. Posteriormente, las proteínas presentes en los sobrenadantes se precipitaron y dializaron según se describió en el apartado 8.1. Por otro lado, se cultivaron plántulas de pepino en cajas Phytatray™ II (Sigma) con medio líquido PGM durante 9 días bajo condiciones controladas de crecimiento (apartado 5.4).

Para llevar a cabo el ensayo, cada plántula se transfirió a un vial conteniendo 200 μL del concentrado proteico de la cepa correspondiente. Los viales se colocaron en cajas Magenta® GA-7 (Sigma) insertados en una rejilla metálica a modo de soporte (**Figura 43**), y se incubaron en fitotrón bajo condiciones controladas de crecimiento (25°C, 16 h de luz y 75 % de humedad relativa). Como control negativo se empleó agua ultrapura estéril en lugar del sobrenadante, y como control positivo 600 nmoles de SA (3 nmol/ μL). Como control adicional se incluyeron sobrenadantes hervidos durante 10 min. Tras 24 hpi se recogieron las hojas cotiledonares de 3 plántulas por cada tratamiento, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -20°C hasta el momento de la extracción de ARN y síntesis de ADNc (apartados 6.5.2 y 6.6, respectivamente). Las muestras recogidas se analizaron mediante PCR a tiempo real con el fin de medir la expresión de genes marcadores de defensa. El ensayo se realizó dos veces.

10.5.7.2.2. *In vivo*

Para llevar a cabo los ensayos *in vivo* se cultivaron plántulas de pepino en cajas Phytatray™ II (Sigma) con medio líquido PGM inoculado con germínulas de la cepa de *T. harzianum* correspondiente (según se describió en el apartado 10.5.3.2). Como control negativo se utilizó agua destilada estéril en lugar de germínulas, y como control positivo se utilizó SA (300 µmoles/mL). Tras 48 h de incubación se recolectaron las hojas cotiledonares de 6 plántulas por cada tratamiento, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y se conservaron a -20°C hasta el momento de la extracción de ARN y síntesis de ADNc (apartados 6.5.2 y 6.6, respectivamente). Las muestras recogidas se analizaron mediante PCR a tiempo real con el fin de medir la expresión de genes marcadores de defensa. El ensayo se realizó dos veces.

11. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

Las cepas de *T. harzianum* marcadas con la proteína GFP (**Tabla 4**) se observaron en interacción con las raíces de pepino mediante microscopía confocal láser de fluorescencia. Las muestras de raíces inoculadas con estas cepas se montaron en una solución 10 µM de yoduro de propidio (Sigma) para teñir la pared celular vegetal. Las muestras se visualizaron en un microscopio Leica TCS SP2 aplicando una longitud de onda de excitación de 488 nm con un láser de argón y recogiendo la luz emitida a 500-550 nm, en el caso de la fluorescencia emitida por la proteína GFP, y a 600-700 nm, en el caso de la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio. Las proyecciones se llevaron a cabo capturando imágenes individuales cada 1-2 µm y superponiéndolas con el programa informático Leica LCS (v.2.61.1537).

12. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y ESTADÍSTICAS

12.1. Análisis de secuencias de ADN y proteínas

La comparación de secuencias de ADN y proteínas con las bases de datos públicas se llevó a cabo utilizando las diferentes variantes del algoritmo BLAST (Blastn, Blastx, Blastp), en el servidor del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

La anotación de secuencias/genes de *T. harzianum* se llevó a cabo según la terminología y estructura jerárquica *Gene Ontology* (GO; Ashburner y col., 2000; <http://www.geneontology.org>) utilizando el programa Blast2GO (Gotz y col., 2008; <http://www.blast2go.com>).

El paquete informático Lasergene (DNASTAR) se utilizó en el análisis y edición de secuencias de ADN y de proteínas (búsqueda de marcos abiertos de lectura, alineamientos, traducción, ensamblaje de fragmentos de secuencias, diseño de oligonucleótidos).

El programa Vector NTI (Invitrogen) se utilizó para la construcción (dibujo y edición) de vectores plasmídicos, permitiendo identificar fácilmente sitios de restricción y de localización de oligonucleótidos. Asimismo permite simular carreras electroforéticas de plásmidos digeridos con enzimas de restricción con el fin de predecir el patrón de bandas obtenido.

El programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>) se utilizó en el manejo de los cromatogramas procedentes de la secuenciación de ADN, así como en la exportación de las secuencias a distintos formatos.

La herramienta SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*), disponible en la dirección web <http://smart.embl.de>, y las aplicaciones Scan Prosite (www.expasy.org/tools/scanprosite/) e *InterPro protein sequence analysis & classification*

(www.ebi.ac.uk/interpro/) se utilizaron en la búsqueda de motivos o dominios en secuencias proteicas.

El programa SignalP v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP-2.0/>) se utilizó en la predicción de péptidos señal en secuencias proteicas.

12.2. Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico de datos se llevó a cabo utilizando el programa informático SPSS 17.0. Con el fin de comprobar si las diferencias encontradas en el comportamiento de las distintas cepas fúngicas analizadas eran estadísticamente significativas, se llevaron a cabo análisis de la varianza (ANOVA) y comparaciones *post hoc* mediante el test de Duncan ($P=0,05$).

Bibliografía

- Adesemoye, A. O. y Kloepper, J. W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 1-12.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A. y Kloepper, J. W. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* **58**: 921-929.
- Aliferis, K. A. y Jabaji, S. (2010). Metabolite composition and bioactivity of *Rhizoctonia solani* sclerotial exudates. *J Agric Food Chem* **58**: 7604-7615.
- Almeida, F. B., Cerqueira, F. M., Silva, R. N., Ulhoa, C. J. y Lima, A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett* **29**: 1189-1193.
- Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E. y Nicolás, C. (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol Plant Pathol* **15**: 823-831.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. y 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**: 2926-2933.
- Appella, E., Weber, I. T. y Blasi, F. (1988). Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett* **231**: 1-4.
- Arnao, M. B. (2014). Phyto-melatonin: discovery, content, and role in plants. *Adv Bot* **2014**: 1-11.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. y Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**:25-29.
- Askolin, S., Penttilä, M., Wösten, H. A. B. y Nakari-Setälä, T. (2005). The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 281-288.
- Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Coulpier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P. y Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* **14**: 121.
- Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H. y Tweddell, R. J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol Biochem* **40**: 1733-1740.
- Azarmi, R., Hajieghrari, B. y Giglou, A. (2011). Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *Afr J Biotechnol* **10**: 5850-5855.
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., Vinyard, B. T. y Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biol Control* **46**: 24-35.
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., Samuels, G. J., Choi, I-Y. y Holmes, K. A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* **224**: 1449-1464.
- Bailey, B. A., Strem, M. D. y Wood, D. (2009). *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycol Res* **113**: 1365-1376.

- Battaglia, D., Bossi, S., Cascone, P., Digilio, M. C., Prieto, J. D., Fanti, P., Guerrieri, E., Iodice, L., Lingua, G., Lorito, M., Maffei, M. E., Massa, N., Ruocco, M., Sasso, R. y Trotta, V. (2013). Tomato below ground-above ground interactions: *Trichoderma longibrachiatum* affects the performance of *Macrosiphum euphorbiae* and its natural antagonists. *Mol Plant Microbe Interact* **26**: 1249-1256.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* **7**: 249-260.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc* **57**: 289-300.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 11-18.
- Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S. y Masle, J. (2008). Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 3430-3447.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. *Can J Bot* **60**: 2357-2372.
- Bolckmans, K. (2008). Biocontrol files. *Can Bull Ecol Pest Manag* **13**: 1-10.
- Bommer, U-A. (2012). Cellular function and regulation of the translationally controlled tumour protein TCTP. *Open Allergy J* **5**: 19-32.
- Bonaccorsi, E. D., Ferreira, A. J., Chambergo, F. S., Ramos, A. S., Mantovani, M. C., Farah, J. P., Sorio, C. S., Gombert, A. K., Tonso, A. y El-Dorry, H. (2006). Transcriptional response of the obligatory aerobic *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen. *Biochemistry* **45**: 3912-3924.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Breakspear, A. y Momany, M. (2007). The first fifty microarray studies in filamentous fungi. *Microbiology* **153**: 7-15.
- Breitenbach, H. H., Wenig, M., Wittek, F., Jordá, L., Maldonado-Alconada, A. M., Sarioglu, H., Colby, T., Knappe, C., Bichlmeier, M., Pabst, E., Mackey, D., Parker, J. E. y Vlot, A. C. (2014). Contrasting roles of apoplastic aspartyl protease AED1 and legume lectin-like protein LLP1 in Arabidopsis systemic acquired resistance. *Plant Physiol* **165**: 791-809.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. y Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* **147**: 779-789.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Tohge, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A. y Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog* **9**: e1003221.
- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S. y Kubicek, C. P. (2003). The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* **43**: 289-295.
- Calderón, A., A., Zapata, J. M., Muñoz, R., Pedreño, M. A. y Barceló, R. (1993). Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *New Phytol* **124**: 455-463.
- Carapito, R., Hatsch, D., Vorwerk, S., Petkovski, E., Jeltsch, J-M. y Phalip, V. (2008). Gene expression in *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Fungal Genet Biol* **45**: 738-748.

- Cardoza, R. E., Vizcaíno, J. A., Hermosa, M. R., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2006a). A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Microbiol* **44**: 383-395.
- Cardoza, R. E., Vizcaíno, J. A., Hermosa, R. H., Sousa, S., González F. J., Llobell, A., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2006b). Cloning and characterization of the *erg1* gene of *Trichoderma harzianum*: Effect of the *erg1* silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine. *Fung Gen Biol* **43**: 164-178.
- Carman, G. M. y Han, G-S. (2009). Regulation of phospholipid synthesis in yeast. *J Lipid Res* **50**: S-69-S73.
- Carsolio, C., Gutierrez, A., Jimenez, B., van Montagu, M. y Herrera-Estrella, A. (1994). Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10903-10907.
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defense priming. *Trends Plant Sci* **16**: 524-531.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R. y López-Bucio, J. (2014). *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Mol Plant Microbe Interact* **27**: 503-514.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. y López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**: 1579-1592.
- Cortés, C., Gutiérrez, A., Olmedo, V., Inbar, J., Chet, I. y Herrera-Estrella, A. (1998). The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Mol Gen Genet* **260**: 218-225.
- Cowling, E., Galloway, J., Furiness, C., Barber, M., Bresser, T., Cassman, K., Erisman, J. W., Haeuber, R., Howarth, R., Melillo, J., Moomaw, W., Moiser, A., Sanders, K., Seitzinger, S., Smeulders, S., Socolow, R., Walters, D., West, F. y Zhu, Z. (2001). Optimizing nitrogen management in food and energy production and environmental protection: summary statement from the Second International Nitrogen Conference. *Scientific World Journal* **1**: 1-9.
- Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M. Llobell, A. y Delgado-Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol* **10**: 19-27.
- Chambergo, F. S., Bonaccorsi, E. D., Ferreira, A. J., Ramos, A. S., Ferreira Junior, J. R., Abrahao-Neto, J., Farah, J. P. y El-Dorry, H. (2002). Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem* **277**: 13983-13988.
- Chaverri, P. y Samuels, G. J. (2002). *Hypocrea lixii* Pat., the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. *Mycol Prog* **1**: 283-286.
- Chaverri, P. y Samuels, G. J. (2013). Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution* **67**: 2823-2837.
- Chaverri, P., Samuels, G. J. y Stewart, E. L. (2001). *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* **93**: 1113-1124.
- Chen, Y. L., Montedonico, A. E., Kauffman, S., Dunlap, J. R., Menn, F. M. y Reynolds, T. B. (2010). Phosphatidylserine synthase and phosphatidylserine decarboxylase are essential for cell wall integrity and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **75**: 1112-1132.

- Chen, X-L., Yang, J. y Peng, Y-L. (2011a).** Large-scale insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Methods Mol Biol* **722**: 213-224.
- Chen, L., Yang, X., Raza, W., Li, J., Liu, Y., Qiu, M., Zhang, F. y Shen, Q. (2011b).** *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 1653-1663.
- Chet, I., Harman, G. E. y Baker, R. (1981).** *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microb Ecol* **7**: 29-38.
- Daubner, S. C., Gadda, G., Valley, M. P. y Fitzpatrick, P. F. (2002).** Cloning of nitroalkane oxidase from *Fusarium oxysporum* identifies a new member of the acyl-CoA dehydrogenase superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2702-2707.
- Delgado-Jarana, J., Rincón, A. M. y Benítez, T. (2002).** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology* **148**: 1305-1315.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. y Hicks, J. B. (1983).** A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**: 19-21.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Męglecz, E. y Roncero, M. I. G. (2001).** A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol* **39**: 1140-1152.
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R. y Kenerley, C. M. (2006).** Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 838-853.
- Djonović, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A. y Kenerley, C. M. (2007).** A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol* **145**: 875-889.
- Dodds, P. N. y Rathjen, J. P. (2010).** Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539-548.
- Donoso, E. P., Bustamante, R. O., Carú, M. y Niemeyer, H. M. (2008).** Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *App Environ Microbiol* **74**: 1412-1417.
- Dou, K., Wang, Z., Zhang, R., Wang, N., Fan, H., Diao, G. y Liu, Z. (2014).** Cloning and characteristic analysis of a novel aspartic protease gene *Asp55* from *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiol Res* En prensa.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J, Szakacs, G. y Kubicek, C. P. (2005).** An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol* **42**: 813-828.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G. y Kubicek, C. P. (2006).** The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* **47**: 55-64.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, , Grigoriev, I. V. y Kubicek, C. P. (2011).** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* **9**: 749-759.
- Druzhinina, I. S., Shelest, E. y Kubicek, C. P. (2012).** Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiol Lett* **337**: 1-9.
- Durrant, W. E. y Dong, X. (2004).** Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185-209.

- Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* **19**: 709-714.
- Elad, Y., Chet., I., Boyle, P. y Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**: 85-88.
- Elad, Y., Chet., I. y Henis, Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* **28**: 719-725.
- Elad, Y. y Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* **105**: 177-189.
- FAO. (2009). Increasing crop production sustainably. The perspective of biological processes. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. <http://www.fao.org/docrep/012/i1235e/i1235e00.htm>
- FAO. (2010). International code of conduct on the distribution and use of pesticides -Guidance on pest and pesticide management policy development. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Policy_2010.pdf
- FAO. (2011). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2010-2011. Las mujeres en la agricultura. Cerrar la brecha de género en eras del desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. <http://www.fao.org/docrep/013/i2050s/i2050s.pdf>
- Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D. R., Muday, G. K. y Lorenzo, O. (2011). Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 18506-18511.
- Fleet, G. H. y Phaff, H. J. (1974). Glucanases in *Schizosaccharomyces*. Isolation and properties of the cell wall-associated b(1-3)glucanases. *J Biol Chem* **249**: 1717-1728.
- Flores, A., Chet, I. y Herrera-Estrella, A. (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr Genet* **31**: 30-37.
- Fofana, B., Benhamou, N., McNally, D. J., Labbé, C., Séguin, A. y Bélanger, R. R. (2005). Suppression of induced resistance in cucumber through disruption of the flavonoid pathway. *Phytopathology* **95**: 114-123.
- Folin, O. y Ciocalteu, V. (1929). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* **73**: 627-650.
- Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., Goedegebuur, F., Houfek, T. D., England, G. J., Kelley, A. S., Meerman, H. J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H. A., Teunissen, P. J., Yao, J. y Ward, M. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* **278**: 31988-31997.
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300.
- Galloway, J. N. (2005). The global nitrogen cycle: past, present and future. *Sci China C Life Sci* **48**: 669-678.
- Gams, W. y Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. En *Trichoderma and Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics* (vol. 1), pp. 3-34. Eds.: C. P. Kubicek y G. E. Harman. Taylor y Francis, Londres, Reino Unido.

- García, I., Lora, J. M., de la Cruz, J., Benítez, T., Llobell, A. y Pintor Toro, J. A. (1994). Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **27**: 83-89.
- Ge, H., Walhout, A. J. y Vidal, M. (2003). Integrating "omic" information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet* **19**: 551-560.
- Geremia, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S. B., van Montagu M. y Herrera-Estrella, A. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol Microbiol* **8**: 603-613.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L. y Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol* **30**: 250-258.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. y Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* **119**: 329-339.
- Gong, X., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Yi, X. y Peng, Y. (2007). L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1368-1379.
- Gorsche, R., Jovanovic, B., Gudynaite-Savitch, L., Mach, R. L. y Mach-Aigner, A. R. (2014). A highly sensitive *in vivo* footprinting technique for condition-dependent identification of *cis* elements. *Nucleic Acids Res* **42**: e1.
- Gotz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talon, M., Dopazo, J. y Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* **36**: 3420-3435.
- Gowda, M., Venu, R. C., Raghupathy, M. B., Nobuta, K., Li, H., Wing, R., Stahlberg, E., Couglan, S., Haudenschild, C. D., Dean, R., Nahm, B. H., Meyers, B. C. y Wang, G. L. (2006). Deep and comparative analysis of the mycelium and appressorium transcriptomes of *Magnaporthe grisea* using MPSS, RL-SAGE, and oligoarray methods. *BMC Genomics* **7**: 310.
- Gravel, V., Antoun, H. y Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem* **39**: 1968-1977.
- Grigoriev, I. V., Nordberg, H., Shabalov, I., Aerts, A., Cantor, M., Goodstein, D., Kuo, A., Minovitsky, S., Nikitin, R., Ohm, R. A., Otilar, R., Poliakov, A., Ratnere, I., Riley, R., Smirnova, T., Rokhsar, D. y Dubchak, I. (2012). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Res* **40**: D26-D32.
- Grinyer, J., Hunt, S., McKay, M., Herbert, B. R. y Nevalainen, H. (2005). Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* **47**: 381-388.
- Gutiérrez, S., Velasco, J., Marcos, A.T., Fernández, F.J., Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B. y Martín, J.F. (1997). Expression of the *cefG* is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**: 606-614.
- Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773-1791.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hannun, Y. A. y Obeid, L. M. (2002). The ceramide-centric universe of lipid mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* **277**: 25847-25850.

- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* **84**: 377-393.
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **96**: 190-194.
- Harman, G. E. (2011). Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* **189**: 647-649.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* **2**: 43-56.
- Harman, G. E., Obregón, M. A., Samuels, G. J. y Lorito, M. (2010). Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. *Plant Disease* **94**: 928-939.
- Hartl, L., Kubicek, C. P. y Seiboth, B. (2007). Induction of the gal pathway and cellulose genes involves no transcriptional inducer function of the galactokinase in *Hypocrea jecorina*. *J Biol Chem* **282**: 18654-18659.
- Hartl, L., Zach, S. y Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 533-543.
- Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E. Y Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int Microbiol* **16**: 69-80.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* **158**: 17-25.
- Hoagland, D. R. y Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp St Circ* **347**: 1-32.
- Hong, J. K., Yun, B-W., Kang, J-G, Raja, M. U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y. y Loake, G. J. (2008). Nitric oxide function and signaling in plant disease resistance. *J Exp Bot* **59**: 147-154.
- Huang, X. y Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**: 868-877.
- Ihrmark, K., Asmail, N., Ubhayasekera, W., Melin, P., Stenlid, J. y Karlsson, M. (2010). Comparative molecular evolution of *Trichoderma* chitinases in response to mycoparasitic interactions. *Evol Bioinf Online* **6**: 1-26.
- Inbar, J. y Chet, I. (1995). The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* **141**: 2823-2829.
- Inbar, J., Menendez, A. y Chet, I. (1996). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol Biochem* **28**: 757-763.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. y Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**: 249-264.
- Ivanchenko, M. G., Muday, G. K. y Dubrovsky (2008). Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **55**: 335-347.
- Jones, J. D. y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.

- Jung, U. S. y Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**: 1049-1057.
- Kamilova, F. y de Bruyne, R. (2013). Plant growth promoting microorganisms: the road from an academically promising result to a commercial product. En *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (vol 2), pp. 677-686. Ed.: F. J. de Bruijn. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, EE. UU.
- Kanehisa, M. y Bork, P. (2003). Bioinformatics in the post-sequence era. *Nat Genet* **33**: 305-310.
- Kang, K., Zhong, J., Jiang, L., Liu, G., Gou, C. Y., Wu, Q., Wang, Y., Luo, J. y Gou, D. (2013). Identification of microRNA-like RNAs in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* by Solexa sequencing. *PLoS One* **8**: e76288.
- Kopchinskiy, A., Komoń, M., Kubicek, C. P. y Druzhinina, I. S. (2005). TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycol Res* **109**: 658-660.
- Korolev, N., Rav David, D. y Elad, Y. (2008). The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Biocontrol* **53**: 667-683.
- Kredics, L., Antal, Z., Doczi, I., Manczinger, L., Kevei, F. y Nagy, E. (2003). Clinical importance of the genus *Trichoderma* – a review. *Acta Microbiol Immunol Hungarica* **50**: 105-117.
- Kredics, L., Kocsubé, S., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L. y Vágvölgyi, C. (2009). Extracellular proteases of mycoparasitic and nematophagous fungi. En *Applied Mycology*, pp. 290-307. Eds.: M. Rai y P. D. Bridge. CAB International, Wallingford, CT, EE. UU.
- Kruszewska, J. S. (1999). Heterologous expression of genes in filamentous fungi. *Acta Biochim Pol* **46**: 181-195.
- Kubicek, C. P., Baker, S., Gamauf, C., Kenerley, C. M. y Druzhinina, I. S. (2008). Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*. *BMC Evol Biol* **10**: 8:4.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Couplier, F., Deshpande, N., von Döhren, H., Ebbole, D. J., Esquivel-Naranjo, E. U., Fekete, E., Flippi, M., Glaser, F., Gómez-Rodríguez, E. Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández-Oñate, M., Karaffa, L., Kostı, I., Le Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, P. S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E. E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo-Ramos, J. A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H. H., Zhang, M., Coutinho, P. M., Kenerley, C. M., Monte, E., Baker, S. E. y Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol* **12**: R40.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T. y 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**: 7755-7760.
- Latgé, J-P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* **66**: 279-290.
- Le Crom, S., Schackwitz, W., Pennacchio, L., Magnuson, J. K., Culley, D. E., Collett, J. R., Martin, J., Druzhinina, I. S., Mathis, H., Monot, F., Seiboth, B., Cherry, B., Rey, M., Berka, R., Kubicek, C. P., Baker, S. E. y Margeot, A. (2009). Tracking the roots of cellulose hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 16151-16156.

- Lehr, P. (2012). Global markets for biopesticides. Report code CHM029D, BBC Research.
- LéJohn, H. B. (1971). D(-)-lactate dehydrogenases in fungi. Kinetics and allosteric inhibition by guanosine triphosphate. *J Biol Chem* **246**: 2116-2126.
- Li, S., Du, L., Yuen, G. y Harris, S. D. (2006). Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **17**: 1218-1227.
- Limón, M. C., Pintor-Toro, J. A. y Benítez, T. (1999). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* **89**: 254-261.
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T. y Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 877-896.
- Liu, Y. y Yang, Q. (2007). Cloning and heterologous expression of aspartic protease SA76 related to biocontrol in *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett* **277**: 173-181.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. y Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 280-287.
- Lora, J. M., Pintor-Toro, J. A., Benítez, T. y Romero, L. C. (1995). Qid3 protein links plant bimodular proteins with fungal hydrophobins. *Mol Microbiol* **18**: 380-382.
- Lorito, M., Woo, S. L., D' Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P. y Scala, F. (1996). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol Plant Microbe Interact* **9**: 206-213.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. y Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 395-417.
- Mach, R. L., Schindler, M. y Kubicek, C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet* **25**: 567-570.
- Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turra, D., Fogliano, V., Scala, F. y Lorito, M. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr Genet* **50**: 307-321.
- Martínez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P. M., Cullen, D., Danchin, E. G., Grigoriev, I. V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C. P., Han, C. S., Ho, I., Larrondo, L. F., de Leon, A. L., Magnuson, J. K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A. A., Schmolli, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C. L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M. A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C. R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D. S., Lucas, S. M., Rubin, E. M., Dunn-Coleman, N., Ward, M. y Brettin, T. S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* **26**: 553-560.
- Martínez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M. y Baccou, J-C. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol* **127**: 334-344.
- Mastouri, F., Björkman, T. y Harman, G. E. (2010). Seed treatments with *Trichoderma harzianum* alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* **100**: 1213-1221.
- Mastouri, F., Björkman, T. y Harman, G. E. (2012). *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 1264-1271.

- Masunaka, A., Hyakumachi, M. y Takenaka, S. (2011). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ* **26**: 128-134.
- Mathys, J., De Cremer, K., Timmermans, P., van Kerckhove, S., Lievens, B., Vanhaecke, M., Cammue, B. P. A. y De Coninck, B. (2012). Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Front Plant Sci* **3**: 108.
- McNally, D. J., Wurms, K. V., Labbé, C. y Bélanger, R. R. (2003). Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiol Mol Plant Pathol* **63**: 293-303.
- Mendoza-Mendoza, A., Rosales-Saavedra, T., Cortés, C., Castellanos-Juárez, V., Martínez, P. y Herrera-Estrella, A. (2007). The MAP kinase TVK1 regulates conidiation, hydrophobicity and the expression of genes encoding cell wall proteins in the fungus *Trichoderma virens*. *Microbiology* **153**: 2137-2147.
- Miller, S. A., Beed, F. D. y Harmon, C. L. (2009). Plant disease diagnostic capabilities and networks. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 15-38.
- Ming, Q., Su, C., Zheng, C., Jia, M., Zhang, Q., Zhang, H., Rahman, K., Han, T. y Qin, L. (2013). Elicitors from the endophytic fungus *Trichoderma atroviride* promote *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone biosynthesis. *J Exp Bot* **64**: 5687-5694.
- Mishra, A., Kumari, M., Pandey, S., Chaudhry, V., Gupta, K. C. y Nautiyal, C. S. (2014). Biocatalytic and microbial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. *Bioresour technol* **166**: 235-242.
- Molassiotis, A. y Fotopoulos, V. (2011). Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree? *Plant Signal Behav* **6**: 210-214.
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* **4**: 1-4.
- Montero-Barrientos, M., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Monte, E. y Hermosa, R. (2007). The heterologous overexpression of *hsp23*, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. *Curr Genet* **52**: 45-53.
- Morán-Diez, M. E., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Monte, E. y Hermosa, R. (2010). *TvDim1* of *Trichoderma virens* is involved in redox-processes and confers resistance to oxidative stresses. *Curr Genet* **56**: 63-73.
- Morán-Diez, E., Hermosa, M. R., Ambrosio, P., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Lorito, M. y Monte, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1021-1031.
- Morán-Diez, E., Rubio, B., Domínguez, S., Hermosa, R., Monte, E. y Nicolás, C. (2012). Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *J Plant Physiol* **169**: 614-620.
- Moreno-Mateos, M. A., Delgado-Jarana, J., Codón, A. C. y Benítez T. (2007). pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1355-1367.
- Morrissey, J. P., Dow, J. M., Mark, G. L. y O'Gara, F. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture. *EMBO Rep* **5**: 922-926.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M. y Kenerly, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 105-129.

- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A. y Kenerley, C. M. (2012).** Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology* **158**: 35-45.
- Mukherjee, P., Roy, M., Mandal, B. P., Dey, G. K., Mukherjee, P. K., Ghatak, J., Tyagi, A. K. y Kale, S. P. (2008).** Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology* **19**: 075103.
- Mukherjee, P. K., Sherkhane, P. D. y Murthy, N. B. K. (1999).** Induction of stable benomyl-tolerant phenotypic mutants of *Trichoderma pseudokoningii* MTCC 3011 and their evaluation for antagonistic and biocontrol potential. *Indian J Exp Biol* **37**: 710-712.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273.
- Muñoz, G., Nakari-Setälä, T., Agosin, E. y Penttilä, M. (1997).** Hydrophobin gene *shr1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **32**: 225-230.
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J. Oughan, H. y Prats E. (2008).** The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* **59**: 501-520.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* **15**: 473-497.
- Murch, S. J., KrishnaRaj, S. y Saxena, P. K. (2000).** Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Rep* **19**: 698-704.
- Murphy, C., Powlowski, J., Wu, M., Butler, G. y Tsang, A. (2011).** Curation of characterized glycoside hydrolases of fungal origin. *Database (Oxford)* **2011**: bar020.
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J. y Hube, B. (2003).** *Candida albicans* secreted aspartil proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400-428.
- National Academy of Sciences. (1987).** Report of the research briefing panel on biological control in managed ecosystems. National Academy Press, Washington, DC, EE. UU.
- Naumann, C., Hartmann, T. y Ober, D. (2002).** Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloiddefended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6085-6090.
- Navazio, L., Baldan, B., Moscatiello, R., Zuppini, A., Woo, S. L. Mariani, P., y Lorito, M. (2007).** Calcium-mediated perception and defense responses activates in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biol* **7**: 41.
- Nevalainen H. y Peterson, R. (2014).** Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Front Microbiol* **5**:75.
- Ninnemann, H. y Maier, J. (1996).** Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem Photobiol* **64**: 393-398.
- Norbeck, J. y Blomberg, A. (1997).** Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1,4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J Biol Chem* **272**: 5544-5554.
- Nowrousian, M. (2010).** Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems. *Eukaryot Cell* **9**: 1300-1310.

- Oh, Y. T., Ahn, C.-S., Jeong, Y. J., Kim, J. G., Ro, H.-S., Han, K.-H., Lee, C.-W. y Kim, J. W. (2013). *Aspergillus nidulans* translationally controlled tumor protein has a role in the balance between asexual and sexual differentiation and normal hyphal branching. *FEMS Microbiol Lett* **343**: 20-25.
- Okon, Y., Chet, I. y Henis, Y. (1973). Effect of lactose, ethanol and cycloheximide on the translocation pattern of radioactive compounds and on sclerotium formation in *Sclerotium rolfsii*. *J Gen Microbiol* **74**: 251-258.
- Papapostolou, I. y Georgiou, C. D. (2010). Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. *Microbiology* **156**: 960-966.
- Papavizas, G. C. y Lewis, J. A. (1983). Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. *Phytopathology* **73**: 407-411.
- Park, G., Colot, H. V., Collopy, P. D., Krystofova, S., Crew, C., Ringelberg, C., Litvinkova, L., Altamirano, L., Li, L., Curilla, S., Wang, W., Gorrochotegui-Escalante, N., Dunlap, J. C. y Borkovich, K. A. (2011). High-throughput production of gene replacement mutants in *Neurospora crassa*. *Methods Mol Biol* **722**: 179-189.
- Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A. y Scala, A. (1999). Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *J Biol Chem* **274**: 24959-24964.
- Pazzagli, L., Seidl-Seiboth, V., Barsottini, M., Vargas, W. A., Scala, A. y Mukherjee, P. K. (2014). Cerato-platanins: elicitors and effectors. *Plant Sci En* *pre*.
- Pelagio-Flores, R., Muñoz-Parra, E., Ortíz-Castro, R. y López-Bucio, J. (2012). Melatonin regulates Arabidopsis root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *J Pineal Res* **53**: 279-288.
- Pelagio-Flores, R., Ortíz-Castro, R., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L. y López-Bucio, J. (2011). Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **52**: 490-508.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. y Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**: 155-164.
- Peterson, R. y Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. *Microbiology* **158**: 58-68.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., van der Ent, S. y van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chem Biol* **5**: 308-316.
- Pietrella, D., Rachini, A., Pandey, N., Schild, L., Netea, M., Bistoni, F., Hube, B. y Vecchiarelli, A. (2010). The inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun* **78**: 4754-4762.
- Pócsi, I., Prade, R. A. y Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* **49**: 1-76.
- Poolman, B., Royer, T. J., Mainzer, S. E., Schmidt, B. F. (1990). Carbohydrate utilization in *Streptococcus thermophilus*: characterization of the genes for aldose 1-epimerase (mutarotase) and UDPglucose 4-epimerase. *J Bacteriol* **172**: 4037-4047.
- Pozo, M. J., Baek, J. M., García, J. M. y Kenerley, C. M. (2004). Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. *Fungal Genet Biol* **41**: 336-348.

- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M. M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J. B. y Mercado-Blanco, J. (2011). Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microb Ecol* **62**: 435-445.
- Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H. y van den Hondel, C. A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**: 117-124.
- Qi, W. y Zhao, L. (2013). Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *J Basic Microbiol* **53**: 355-364.
- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S. A. y Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett* **35**: 1461-1466.
- Ramakrishna, A., Giridhar, P. y Ravishankar, G. A. (2011). Phyto serotonin. *Plant Signal Behav* **6**: 800-809.
- Rao, Z., Handford, P., Mayhew, M., Knott, V., Brownlee, G. G. y Stuart, D. (1995). The structure of a Ca²⁺-binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions. *Cell* **82**: 131-141.
- Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. (2004). Introduction: aspartic peptidases and their clans. En *Handbook of Proteolytic Enzymes* (vol. 1), pp. 3-12. Eds.: A. J. Barrett, N. D. Rawlings y J. F. Woessner. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. y Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **40**: D343-D350.
- Rehner, S. A. y Samuels, G. J. (1995). Molecular systematics of the Hypocreales: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Can J Bot* **73**: S816-S823.
- Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L. y Herrera-Estrella, A. (2011). Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4361-4370.
- Rey, M., Llobell, A., Monte, E., Scala, F. y Lorito, M. (2004). Genomics of *Trichoderma*. En *Applied Mycology & Biotechnology. Fungal Genomics* (vol. 4), pp. 225-248. Eds.: D. K. Arora y G. G. Khachatourians. Elsevier Science, Amsterdam, Holanda.
- Rey, M., Ohno, S., Pintor-Toro, J. A., Llobell, A. y Benítez, T. (1998). Unexpected homology between inducible cell wall protein QID74 of filamentous fungi and BR3 salivary protein of the insect *Chironomus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6212-6216.
- Ribaudó, C. M., Krumpholz, E. M., Cassán, F. D., Bottini, R., Cantore, M. L. y Curá, J. A. (2006). *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J Plant Growth Regul* **24**: 175-185.
- Richardson, A. E., Barea, J.-M., McNeill, A. M. y Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* **321**: 305-339.
- Richardson, A. R., Libby, S. J. y Fang, F. C. (2008). A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science* **319**: 1672-1676.
- Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* **116**: 1-56.
- Rodríguez-Kábana, R., Kelley, W. D. y Curl, E. A. (1978). Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfsii* in soil. *Can J Microbiol* **24**: 487-490.

- Rosado, I. V. Rey, M., Codón, A. C., Govantes, J., Moreno-Mateos, M. A. y Benítez, T. (2007). QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genet Biol* **44**: 950-964.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E. U., Casas-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortés-Penagos, C. y Herrera-Estrella, A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* **152**: 3305-3317.
- Rossmann, A. Y., Seifert, K. A., Samuels, G. J., Minnis, A. M., Schroers, H. J., Lombard, L., Crous, P. W., Pöldmaa, K., Cannon, P. F., Summerbell, R. C., Geiser, D. M., Zhuang, W. Y., Hirooka, Y., Herrera, C., Salgado-Salazar, C. y Chaverri, P. (2013). Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus* **4**: 41-51.
- Rotblat, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J., M., Schuster, S. y Avni, A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J* **32**: 1049-1055.
- Rubio, M. B., Domínguez, S., Monte, E. y Hermosa, R. (2012). Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology* **158**: 119-128.
- Rubio, M. B., Quijada, N. M., Pérez, E., Domínguez, S., Monte, E. y Hermosa, R. (2014). Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *App Environ Microbiol* **80**: 1864-1873.
- Rudd, S. (2003). Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends Plant Sci* **8**: 321-329.
- Ruocco M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L. y 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**: 291-301.
- Saba, H., Vibhash, D., Manisha, M., Prashant, K. S., Farhan, H. y Tauseef, A. (2012). *Trichoderma* – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere* **3**: 524-531.
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A. y Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur J Plant Pathol* **131**: 15-26.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE. UU.
- Samolski, I., de Luis, A., Vizcaíno, J. A., Monte, E. y Suárez, M. B. (2009). Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plant, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiol* **9**: 217.
- Samolski, I., Rincón, A. M., Pinzón, L. M., Viterbo, A. y Monte, E. (2012). The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* **158**: 129-138.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* **96**: 195-206.
- Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F. y McCray, E. B. (2011). *Trichoderma* Online. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/taxadescrotions/keys/TrichodermaIndex.cfm>

- Santi, S. y Schmidt, W. (2008). Laser microdissection-assisted analysis of the functional fate of iron deficiency-induced root hairs in cucumber. *J Exp Bot* **59**: 697-704.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E. y Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4364-4370.
- Schmoll, M., Seibel, C., Tisch, D., Dorrer, M. y Kubicek, C. P. (2010). A novel class of peptide pheromone precursors in ascomycetuous fungi. *Mol Microbiol* **77**: 1483-1501.
- Schuster, A., Bruno, K. S., Collett, J. R., Baker, S. E., Seiboth, B., Kubicek, C. P. y Schmoll, M. (2012). A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels* **5**: 1.
- Schuster, A. y Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 787-799.
- Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E. y Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* **7**: 3943-3952.
- Seiboth, B., Ivanova, C. y Seidl-Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei*: a fungal enzyme producer for cellulosic biofuels, biofuel production-recent developments and prospects. En *Biofuel Production: Recent Developments and Prospects*, pp. 309-40. Ed.: M. A. dos Santos Bernardes. Intech, Rijeka, Croatia.
- Seiboth, B., Karaffa, L., Sándor, E. y Kubicek, C. P. (2002). The *Hypocrea jecorina* gal10 (uridine 5'-diphosphate-glucose 4-epimerase-encoding) gene differs from yeast homologues in structure, genomic organization and expression. *Gene* **295**: 143-149.
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev* **22**: 36-42.
- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G. y Kubicek, C. P. (2006). Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J* **273**: 4346-4359.
- Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C. P. y Schmoll, M. (2009a). Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 13909-13914.
- 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. y Kubicek, C. P. (2009b). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics* **10**: 567.
- Seidl-Seiboth, V., Gruber, S., Sezerman, U., Schwecke, T., Albayrak, A., Neuhof, T., von Döhren, H., Baker, S. E. y Kubicek, C. P. (2011). Novel hydrophobins from *Trichoderma* define a new hydrophobin subclass: protein properties, evolution, regulation and processing. *J Mol Evol* **72**: 339-351.
- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2883-2894.
- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O. y Spiegel, Y. (2001). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **91**: 687-693.
- Shi, M., Chen, L., Wang, X-W., Zhang, T., Zhao, P-B., Song, X-Y., Sun, C-Y., Chen, X-L., Zhou, B-C. y Zhang, Y-Z. (2012). Antimicrobial peptaiboles from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology* **158**: 166-175.

- Shoresh, M., Harman, G. E. y Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 21-43.
- Siddiquee, S., Aishah, S. N., Azad, S. A., Shafawati, S. N. y Naher, L. (2013). Tolerance and biosorption capacity of Zn²⁺, Pb²⁺, Ni³⁺ and Cu²⁺ by filamentous fungi (*Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride* and *T. virens*). *Adv Biosci Biotechnol* **4**: 570-583.
- Siddiqui, I. A., Amer-Zareen, Zaki, M. J. y Shaukat, S. S. (2001). Use of *Trichoderma* species in the control of *Meloidogyne javanica*, the root-knot nematode in okra and mungbean. *Pak J Biol Sci* **4**: 846-848.
- Šimković, M., Gdovinová, A., Zemková, Z. y Varečka, L. (2012). Properties of secreted protease from vegetative *Trichoderma atroviride* mycelia cultivated with protein inducer reveal a complex protein-recognition mechanism. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**: 253-265.
- Šimković, M., Kurucová, A., Hunová, M. y Varečka, L. (2008). Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. *Acta Chim Slov* **1**: 250-264.
- Sofo, A., Tataranni, G., Xiloyannis, C., Dichio, B. y Scopa. (2012). Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6® (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) rootstocks. *Environ Exp Bot* **76**: 33-38.
- Son, H., Seo, Y-S., Min, K., Park, A. R., Lee, J., Jin, J-M., Lin, Y., Cao, P., Hong, S-Y., Kim, E-K., Lee, S-H., Cho, A., Lee, S., Kim, M-G., Kim, Y., Kim, J-E., Kim, J-C., Choi, G. J., Yun, S-H., Lim, J. Y., Kim, M., Lee, Y-H., Choi, Y-D. y Lee, Y-W. (2011). A phenome-based functional analysis of transcription factors in the cereal head blight fungus, *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog* **7**: e1002310.
- Sousa, S. M. (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.
- Soustre, I., Letourneux, Y. y Karst, F. (1996). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* RTA1 gene involved in 7-aminosterol resistance. *Curr Genet* **30**: 121-125.
- St Leger, R. J., Joshi, L. y Roberts, D. W. (1997). Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* **143**: 1983-1990.
- Steindorff, A. S., Silva, R. N., Coelho, A. S. G., Nagata, T., Noronha, E. F. y Ulhoa, C. J. (2012). *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. *Biol Control* **61**: 134-140.
- Steyaert, J. M., Stewart, A., Jaspers, M. V., Carpenter, M. y Ridway, H. J. (2004). Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. *Mycologia* **96**: 1245-1252.
- Studholme, D. J., Harris, B., Le Cocq, K., Winsbury, R., Perera, V., Ryder, L., Ward, J. L., Beale, M. H., Thornton, C. R. y Grant, M. (2013). Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture-insights from genomics. *Front Plant Sci* **4**: 258.
- Suárez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E. y Llobell, A. (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**: 46-55.
- Suárez, M. B., Sanz, L., Chamorro, M. I., Rey, M., González, F. J., Llobell, A. y Monte, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet Biol* **42**: 924-934.

- Suárez, M. B., Vizcaíno, J. A., Llobell, A. y Monte E. (2007). Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Curr Genet* **51**: 331-342.
- Suominen, P. L., Mäntylä, A. L., Karhunen, T., Hakola, S. y Nevalainen, H. (1993). High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. *Mol Gen Genet* **241**: 523-530.
- Szabó, M., Csepregi, K., Gálber, M., Virányi, F. y Fekete, C. (2012). Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: the role of *chi18-5* and *chi18-12* genes in nematode egg-parasitism. *Biol Control* **63**: 121-128.
- ten Have, A., Espino, J. J., Dekkers, E., van Sluyter, S. C., Brito, N., Kay, J., González, C. y van Kan, J. A. L. (2010). The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genet Biol* **47**: 53-65.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agriculture use. *Ind Biotechnol* **2**: 194-208.
- Thines, E. Weber, R. W. S. y Talbot, N. (2000). MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **12**: 1703-1718.
- Tian, M., Benedetti, B. y Kamoun, S. (2005). A second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-relates protease P69B of tomato. *Plant Physiol* **138**: 1785-1793.
- Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chaudhry, V., Mishra, S., Tripathi, R. D. y Nautiyal, C. S. (2013a). *Trichoderma* inoculation ameliorates arsenic induced phytotoxic changes in gene expression and stem anatomy of chickpea (*Cicer arietinum*). *Ecotoxicol Environ Saf* **89**: 8-14.
- Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P., S., Dwivedi, S., Bais, R. T. y Tripathi, R. D. (2013b). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Techn Environ Policy* **15**: 541-550.
- Tseng, S-C., Liu, S-Y., Yang, H-H., Lo, C-T. y Peng, K-C. (2008). Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. *J Agric Food Chem* **56**: 6914-6922.
- Tucci, M., Ruocco, M., de Masi, L., de Palma, M. y Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol Plant Pathol* **12**: 341-354.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. y Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5116-5121.
- UNESCO. (2007). UNESCO-SCOPE Policy Brief: Human alteration of the nitrogen cycle – Threats, benefits and opportunities. <http://unesdoc.unesco.org/images/0015/001509/150916e.pdf>
- Vahabi, K., Mansoori, G. A. y Karimi, S. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei*. *Insciences J* **1**: 65-79.
- van der Biezen, E. A. y Jones, J. D. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**: 544-456.
- van Hulten, M., Pelsler, M., van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J. y Ton, J. (2006). Cost and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 5602-5607.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. y Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 453-483.
- van Loon, L. C., Rep., M. y Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Ann Rev Phytopathol* **44**: 135-162.

- van Zeijl, C. M. J., van den Kamp, E. H. M., Punt, P. J., Selten, G. C. M., Hauer, B., van Gorcom, R. F. M. y van den Hondel, C. A. M. J. J. (1998). An improved colony-PCR method for filamentous fungi for amplification of PCR-fragments of several kilobases. *J Biotechnol* **59**: 221-224.
- Vargas, W. A., Crutcher, F. K. y Kenerley, C. M. (2011). Functional characterization of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytologist* **189**: 777-789.
- Verma, M., Brar, S., K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. y Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem Eng J* **37**: 1-20.
- Vieira, P. M., Coelho, A. S. G., Steindorff, A. S., de Siqueira, S. J. L., Silva, R. N. y Ulhoa, C. J. (2013). Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. *BMC Genomics* **14**: 177.
- Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S. y Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol* **48**: 705-711.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S. L. y Lorito, M. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett* **347**: 123-129.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. y Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant pathogen interactions. *Soil Biol Biochem* **40**: 1-10.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S. y Lorito, M. (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat Prod Commun* **7**: 1545-1550.
- Viterbo A. y Chet, I. (2006). *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* **7**: 249-258.
- Viterbo, A., Harel, M. y Chet, I. (2004). Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiol Lett* **238**: 151-158.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. y Chet, I. (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett* **305**: 42-48.
- Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A. y Chet, I. (2002a). Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr Genet* **42**: 114-122.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. y Chet, I. (2002b). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 549-556.
- Vizcaíno, J. A., González, F. J., Suárez, M. B., Redondo, J., Heinrich, J., Delgado-Jarana, J., Hermosa, R., Gutiérrez, S., Monte, E., Llobell, A. y Rey, M. (2006). Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics* **7**: 193.
- Walters, D., Ratsep, J. y Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot* **64**: 1263-1280.
- Wang, J. y Higgins, V. J. (2005). Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genet Biol* **42**: 284-292.
- Wang, Z. X., Kayingo, G., Blomberg, A. y Prior, B. A. (2002). Cloning, sequencing and characterization of a gene encoding dihydroxyacetone kinase from *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL2547. *Yeast* **19**: 1447-1458.

- Wang, H., Yang, B., Hao, G., Feng, Y., Chen, H., Feng, L., Zhao, J., Zhang, H., Chen, Y. Q., Wang, L. y Chen, W. (2011). Biochemical characterization of the tetrahydrobiopterin synthesis pathway in the oleaginous fungus, *Mortierella alpina*. *Microbiology* **157**: 3059-3070.
- Weber, K. y Osborn, M. (1975). Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrilamide gels and related precedures. En *The proteins* (vol. 1), pp. 179-223. Eds.: H. Neurath y R. L. Hill. Academic Press, New York, EE. UU.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* **22**: 837-845.
- Wendehenne, D., Durner, J. y Klessig, D. F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signaling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 449-455.
- Whiteford, J. R. y Spanu, P. D. (2002). Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Mol Plant Pathol* **3**: 391-400.
- Wieslander, L. (1994). The Balbiani ring multigene family: coding repetitive sequences and evolution of a tissue-specific cell function. *Prog Nucleic Acid Re* **48**: 275-313.
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. y Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* **96**: 181-185.
- Wösten, H. A. B. (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* **55**: 625-646.
- Wouters, M. A., Rigoutsos, I., Chu, C. K., Feng, L. L. Sparrow, D. B. y Dunwoodie, S. L. (2005). Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Sci* **14**: 1091-1103.
- Xia, Y. (2004). Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cell Microbiol* **6**: 905-913.
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R. A. y Lamb, C. (2004). An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO J* **23**: 980-988.
- Xie, B-B., Qin, Q-L, Shi, M., Chen, L-L., Shu, Y-L., Luo, Y., Wang, X-W., Rong, J-C., Gong, Z-T., Li, D., Sun, C-Y., Liu, G-M., Dong, X-W., Pang, X-H., Huang, F., Liu, W., Chen, X-L., Zhou, B-C., Zhang, Y-Z. y Song, X-Y. (2014). Comparative genomics provide insights into evolution of *Trichoderma* nutrition style. *Genome Biol Evol* **6**: 379-390.
- Yang, X., Cong, H., Song, J. y Zhang, J. (2013). Heterologous expression of an aspartic protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma asperellum* in *Pichia pastoris*. *World J Microbiol Biotechnol* **29**: 2087-2094.
- Yang, H-H., Yang, S. L., Peng, K-C., Lo, C-Y. y Liu, S-Y. (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycol Res* **113**: 924-932.
- Yedidia, I., Benhamou, N. y Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1061-1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. y Chet, I. (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol Biochem* **38**: 863-873.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. y Chet, I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7343-7353.
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y. y Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* **235**: 235-242.

- Yu, U., Lee, S. H., Kim, Y. J. y Kim, S. (2004).** Bioinformatics in the post-genome era. *J Biochem Mol Biol* 37: 75-82.
- Zamioudis, C. y Pieterse, C. M. J. (2012).** Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 139-150.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M. y Kubicek, C. P. (1999).** Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet Biol* 26: 131-140.
- Zhang, X. S. y Cheng, H. P. (2006).** Identification of *Sinorhizobium meliloti* early symbiotic genes by use of a positive functional screen. *Appl Environ Microbiol* 72: 2738-2748.

Siglas y Abreviaturas

aa aminoácido
ABA ácido abscísico
ABC *ATP-Binding Cassette*
ACB agente de control biológico
ADN ácido desoxirribonucleico
ADNc ácido desoxirribonucleico complementario
ADNdc ácido desoxirribonucleico de doble cadena
ADNg ácido desoxirribonucleico genómico
ADNp ácido desoxirribonucleico plasmídico
ANOVA análisis de varianza
APS persulfato amónico
ARN ácido ribonucleico
ARNasa ribonucleasa
ARNm ácido ribonucleico mensajero
ARNr ácido ribonucleico ribosómico
ATCC *American Type Culture Collection*
atm atmósfera
ATP adenosín trifosfato
BLAST *Basic Local Alignment Search Tools*
c.s.p. cantidad suficiente para
CBS *Centraalbureau voor Schimmelcultures*
CECT Colección Española de Cultivos Tipo
Ci curio
cm centímetro
CMC carboximetilcelulosa
CFI concentración mínima inhibitoria
col. colaboradores
CWDE *cell wall degrading enzymes*
DAMP *danger-associated molecular pattern*
DEPC dietil pirocarbonato
DIG digoxigenina
DMSO dimetil sulfóxido
dNTPs desoxirribonucleótidos trifosfato
dpi días postinoculación
DTT ditioneitol
EC *Enzyme Commission Number*
EDTA ácido etiléndiaminotetraacético
EE.UU. Estados Unidos
EMBL *European Molecular Biology Laboratory*
ESTs *expressed sequence tags*
ET etileno
ETI *effector-triggered immunity*
ETS *effector-triggered susceptibility*
FAO *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FDR *False Discovery Rate*
g aceleración de la gravedad terrestre
g gramo
GEO *Gene Expression Omnibus Database*
GFP *green fluorescent protein*
GO *Gene Ontology*
h horas
hpi horas postinoculación
HR respuesta hipersensible
IMI *International Mycological Institute*

ISR resistencia sistémica inducida
JA ácido jasmónico
kb kilobase
kDa kilodalton
L litro
M molar
mA miliamperios
MAMP *microbe-associated molecular pattern*
MAPK *mitogen-activated protein kinase*
MES ácido 2-(4-morfolino)-etanosulfónico
mg miligramo
min minutos
MIP manejo integrado de plagas
mJ milijoule
mL mililitro
mM milimolar
mmol milimol
MOPS ácido 3-(N-morfolino)-propano-sulfónico
Mpb megapares de bases
MTI *MAMPs-triggered immunity*
N normal
N.º número
NAS *National Academy of Sciences*
NBT NewBiotechnic S.A.
NCBI *National Center for Biotechnology Information*
ng nanogramo
NGS *Next-Generation Sequencing*
nm nanómetros
nmol nanomol
NO óxido nítrico
NPK nitrógeno-fósforo-potasio
°C grado centígrado
ONU Organización de las Naciones Unidas
ORF marco de lectura abierta
p.ej. por ejemplo
p/p peso/peso
p/v peso/volumen
PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMP *pathogen-associated molecular pattern*
pb pares de bases
PBS tampón fosfato salino
PCR reacción en cadena de la polimerasa
PEG polietilenglicol
PIPES *ácido 1,4-piperazina-dietano-sulfónico*
pmol picomol
ppm partes por millón
PR *pathogenesis-related protein*
PTI *PAMP-triggered immunity*
RNS *reactive nitrogen species*
ROS *reactive oxygen species*
rpm revoluciones por minuto
SA ácido salicílico
SAR resistencia sistémica adquirida
SCAR *sequence characterized amplified region*
SDS dodecil sulfato sódico
seg segundos

sp. especie
spp. especies
TEMED N, N, N', N'-tetrametilen diamina
Tris tri-(hidroximetil) aminometano
Triton X-100 octil fenol etoxilado
U unidad de actividad enzimática
UE Unión Europea
UNESCO *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*
UNINA Univeridad Federico II de Nápoles
UV ultravioleta
V voltio
v. versión
v/v volumen/volumen
vol volumen
vs. *versus*
WT *wild type*
x número de veces de concentración
µg microgramo
µL microlitro
µm micrometro
µM micromolar

Bases Nitrogenadas

A Adenina
C Citocina
G Guanina
T Timina
U Uracilo

Aminoácidos

A (Ala) alanina
C (Cys) cisteína
D (Asp) ácido aspártico
E (Glu) ácido glutámico
F (Phe) fenilalanina
G (Gly) glicina
H (His) histidina
I (Ileu) isoleucina
K (Lys) lisina
L (Leu) leucina
M (Met) metionina
N (Asn) asparragina
P (Pro) prolina
Q (Gln) glutamina
R (Arg) arginina
S (Ser) serina
T (Thr) treonina
V (Val) valina
W (Trp) triptófano
Y (Tyr) tirosina