

0-1073305X



FACULTAD DE BIOLOGÍA

BIBLIOTECA

Universidad de Sevilla
Facultad de Biología
Departamento de Microbiología

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de
Sevilla

TJ-66

**ESTUDIO DE GENES DE *Trichoderma harzianum*
RELACIONADOS CON ESTRÉS NUTRICIONAL.
ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA EXPRESIÓN
HETERÓLOGA DE LAS QUITINASAS CHIT33 Y
CHIT42 EN PLANTAS DE TABACO**

046

142

24-02-04

Mercedes Dana Jiménez

M^a de las Mercedes Dana Jiménez
Universidad de Sevilla
Abril de 2004



Facultad de Biología
Biblioteca

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi
Tesis Doctoral

ESTUDIO DE GENES DE *Trichoderma harzianum* RELACIONADOS
CON ESTRÉS NUTRICIONAL. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA
EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LAS QUITINASAS CHIT33 Y
CHIT42 EN PLANTAS DE TABACO

Sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de usuarios.
- Otros términos.

Firmado: M^a de las Mercedes Dana Jiménez

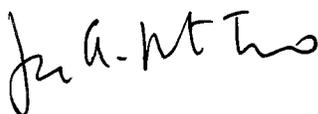
Sevilla, a ____ 30 ____ de _Septiembre de 2005

**ESTUDIO DE GENES DE *Trichoderma harzianum* RELACIONADOS
CON ESTRÉS NUTRICIONAL.
ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE
LAS QUITINASAS CHIT33 Y CHIT42 EN PLANTAS DE TABACO**

Trabajo presentado por la licenciada M^a de las Mercedes Dana Jiménez
para optar al grado de Doctora en Biología

Sevilla, Abril de 2004

El Director de la Tesis



Dr. José Antonio Pintor Toro
Investigador del C.S.I.C.

El doctorando



M^a de las Mercedes Dana Jiménez

Índice

ÍNDICE

Índice general	I
Índice de Figuras	IX
Índice de Tablas	XIII
Abreviaturas	XV
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. EL GÉNERO <i>Trichoderma</i>	3
2. EL GÉNERO <i>Trichoderma</i> COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO	5
2.1. INTERACCIONES CON OTROS HONGOS	5
2.1.1. Antibiosis	6
2.1.2. Micoparasitismo	6
2.1.3. Competición	7
2.2. INTERACCIONES CON PLANTAS	7
2.2.1. Efectos negativos sobre el crecimiento	7
2.2.2. Efectos positivos sobre el crecimiento	8
2.3. USOS POTENCIALES DE <i>Trichoderma</i> EN LA AGRICULTURA	9
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. ORGANISMOS UTILIZADOS	15
1.1. BACTERIAS	15
1.2. LEVADURAS	15
1.3. HONGOS FILAMENTOSOS	15
1.4. PLANTAS	16
2. MEDIOS DE CULTIVO. MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS	16
2.1. BACTERIAS	16
2.2. LEVADURAS	17
2.3. HONGOS FILAMENTOSOS	18
2.3.1. Cultivo para mantenimiento y esporulación	18
2.3.2. Cultivo para la realización de experimentos de inducción y regulación génica	18
2.3.2.1 Ensayos de confrontación	19
2.4. PLANTAS	19
2.4.1. Esterilización de semillas	19
2.4.2 Cultivo <i>in vitro</i>	20
2.4.3. Tratamiento de las plantas con ácido salicílico	20
3. MANIPULACIÓN DE DNA	21
3.1. VECTORES UTILIZADOS	21
3.1.1. Vectores procedentes del bacteriófago λ	21
3.1.2. Vectores plasmídicos y construcciones realizadas	21
3.2 RESTRICCIÓN DEL DNA	23
3.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	24
3.4. PRECIPITACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	24
3.5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	24

3.5.1. Por espectrofotometría	24
3.5.2. Por tinción con bromuro de etidio en gel	24
3.6. GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS	25
3.6.1. Relleno de extremos 5' prominentes	25
3.6.2. Degradación de extremos 3' prominentes	25
3.7. DESFOSFORILACIÓN DE PLÁSMIDOS	25
3.8. LIGACIONES	25
3.8.1. Ligaciones en el vector pCR [®] 4-TOPO	25
4. EXTRACCIÓN DE DNA	25
4.1. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE <i>E.coli</i>	26
4.2. OBTENCIÓN DE DNA DE FAGOS	27
4.3. OBTENCIÓN DE gDNA DE <i>T.harzianum</i>	28
5. EXTRACCIÓN DE RNA	29
5.1 EXTRACCIÓN DE RNA DE LEVADURAS	29
5.2. EXTRACCIÓN DE RNA DE <i>T. harzianum</i>	30
5.3 OBTENCIÓN DE RNA DE PLANTAS	30
6. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	31
6.1. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA	31
6.2. ELECTROFORESIS DE RNA	31
7. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR	31
7.1. REACCIÓN CONVENCIONAL DE PCR	32
7.2. PCR A PARTIR DE BACTERIAS	33
7.3. PCR A PARTIR DE FAGOS	33
7.4. PCR CON ENZIMAS DE ALTA FIDELIDAD	35
7.4.1. Adición de adeninas a fragmentos de PCR	33
8. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR PCR	35
8.1. DISEÑO DE LOS CEBADORES	36
8.2. PRIMERA PCR	37
8.3. SEGUNDA PCR	37
9. ANÁLISIS SOUTHERN (Hibridación DNA-DNA)	38
9.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA Y TRANSFERENCIA A FILTRO	38
9.1.1. Digestión y electroforesis del gDNA	38
9.1.2. Transferencia a membrana del DNA	39
9.1.3. Transferencia de productos de PCR	39
9.1.4. Transferencia de DNA procedente de fagos	39
9.1.5. Transferencia de DNA procedente de colonias	39
9.2. HIBRIDACIÓN Y LAVADOS	40
9.3 DESHIBRIDACIÓN DEL FILTRO	41
10. ANÁLISIS NORTHERN (Hibridación DNA-RNA)	41
10.1 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE RNA.	41
TRANSFERENCIA A FILTRO	
10.2. HIBRIDACIÓN Y LAVADOS	42
10.3. SLOT BLOT	42
11. ESCRUTINIO DE GENOTECAS	43
11.1. ESCRUTINIO DE LA GENOTECA DE gDNA EN λ -GEM [®] 11	43
11.1.1. Preparación de la cepa hospedadora	43
11.1.2. Infección por el fago	43
11.1.3. Preparación e hibridación de filtros	44
11.1.4. Aislamiento de los halos de lisis positivos	44

11.2. ESCRUTINIO DE LA GENOTECA DE cDNA EN λ -ZAP® II.	45
11.2.1. Escisión <i>in vivo</i> por medio del sistema ExAssist/SOLR	45
12. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS	46
12.1. TRANSFORMACIÓN DE <i>E.coli</i>	46
12.1.1. Método químico	46
12.1.1.1. Preparación de células competentes	46
12.1.1.2. Transformación por choque térmico	47
12.1.2. Electroporación	47
12.1.2.1. Preparación de células electrocompetentes	47
12.1.2.2. Transformación	48
12.2. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS.	48
12.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>T.harzianum</i>	49
12.3.1. Obtención de protoplastos	49
12.3.2. Cotransformación de protoplastos	50
13. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	50
13.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	50
13.1.1. Extracción de proteínas totales	50
13.1.1.1. De bacterias	50
13.1.1.2. De levaduras	51
13.1.1.3. De <i>T. harzianum</i>	51
13.1.1.4. De material vegetal	52
13.1.2. Obtención de proteínas extracelulares de <i>T. harzianum</i>	52
13.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	52
13.2.1. Método de Bradford	52
13.2.2. Método de Lowry modificado	53
13.3 ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL DE PROTEÍNAS	53
13.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL	54
14. ANÁLISIS WESTERN (Inmunodetección de proteínas en membrana)	54
14.1. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA	54
14.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS	55
14.3. DESHIBRIDACIÓN DE FILTROS	55
15. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-GLA66	56
15.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGO	56
15.2. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS TRANSFORMANTES	56
15.3. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-GLA66	57
16. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS	57
17. ENSAYOS ENZIMÁTICOS	58
17.1. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LÍTICA SOBRE PAREDES CELULARES DE <i>Trichoderma</i>	58
17.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD GLUCOSA OXIDASA	58
17.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUITINASA	59
17.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD PEROXIDASA	59
17.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD GLUCOAMILASA	60
17.6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA	61
18. ENSAYOS DE FLUORESCENCIA	61
19. PURIFICACIÓN DE PAREDES CELULARES DE HONGOS FILAMENTOSOS	61
20. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PLANTAS DE TABACO	62
20.1. INFECCIÓN CON <i>P.syringae</i> pv <i>tabaci</i>	62
20.1.1. Preparación del inóculo	63

20.1.2. Inoculación	63
20.2. PERMANENCIA DEL PATÓGENO EN LA PLANTA	63
20.3. ENSAYO DE RESISTENCIA DE PLÁNTULAS DE TABACO <i>in vitro</i>	64
20.3.1. Ensayo de resistencia a <i>R. solani</i>	64
20.3.1.1. Preparación de cajas con <i>R. solani</i>	64
20.3.1.2. Infección	64
20.3.2. Ensayo de resistencia a estrés abiótico.	64
21. DIFFERENTIAL DISPLAY	65
21.1. TRATAMIENTO DEL RNA TOTAL CON DNAsaI	66
21.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA DEL mRNA	67
21.3. AMPLIFICACIÓN POR PCR	67
21.4. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%	68
21.5. REAMPLIFICACIÓN DEL cDNA	68
21.6. CONFIRMACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN	69
21.6.1. Northern reverso	69
22. CONSTRUCCIÓN DE LA GENOTECA DE cDNA EN LAMBDA-ZAP	70
22.1. PURIFICACIÓN DE mRNA	72
22.1.1. Preparación de las columnas de oligo(dT)-celulosa	72
22.1.2. Cromatografía en columna	73
22.2. SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE cDNA	73
22.3. SÍNTESIS DE LA SEGUNDA CADENA DE cDNA	73
22.4. LIGACIÓN DE LOS ADAPTADORES <i>EcoRI</i>	74
22.5. DIGESTIÓN CON <i>XhoI</i>	74
22.6. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA	74
22.7. PROCESAMIENTO DE LAS FRACCIONES DE cDNA	75
22.8. LIGACIÓN DEL cDNA AL VECTOR Uni-ZAP XR	75
22.9. EMPAQUETAMIENTO	75
22.10. TITULACIÓN DE LA GENOTECA	76
22.11. AMPLIFICACIÓN DE LA GENOTECA EN Uni-ZAP XR.	76
23. TÉCNICA DE RLM-RACE (RNA Ligase Mediated-Rapid Amplification of cDNA Ends)	77
23.1. DESFOSFORILACIÓN DEL RNA	79
23.2. ELIMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE GUANINA	79
23.3. LIGACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO DE RNA AL EXTREMO 5'	80
23.4. TRANSCRIPCIÓN REVERSA	80
23.5. AMPLIFICACIÓN DEL cDNA	80
CAPÍTULO I. REGULACIÓN DEL GEN <i>chit33</i> DE <i>T. harzianum</i>	83
INTRODUCCIÓN I	85
1. EL SISTEMA QUITINOLÍTICO DE <i>Trichoderma</i>	87
1.1. DEFINICIÓN Y NOMENCLATURA	87
2. LAS QUITINASAS DE <i>T. harzianum</i>	88
2.1. PRINCIPALES FUNCIONES	88
2.2. REGULACIÓN DE LAS QUITINASAS EN <i>T. harzianum</i>	90
2.2.1. Mecanismos de inducción	90

2.2.2. Estructura de las secuencias reguladoras. Estudios de regulación génica	91
RESULTADOS I	95
1. LA REGIÓN REGULADORA DE <i>chit33</i>	97
2. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pZEGA33 Y pMDJ1	99
2.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pZEGA33	100
2.2. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pMDJ1	101
3. OBTENCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES	102
3.1 PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE <i>T. harzianum</i> .	102
ESTABILIZACIÓN DE LOS TRANSFORMANTES	
3.2. ANÁLISIS SOUTHERN DE LOS TRANSFORMANTES	103
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN	103
4.1. ANÁLISIS NORTHERN DE LA EXPRESIÓN DE <i>chit33</i>	103
4.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA REGULACIÓN EJERCIDA POR <i>pchit33</i>	106
4.2.1. Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión	106
4.2.2. Ensayos de confrontación	108
4.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA REGULACIÓN EJERCIDA POR <i>pchit33</i>	108
4.3.1. Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión	108
4.3.2. Efecto ejercido por condiciones de estrés fisiológico	110
DISCUSIÓN I	117
CAPÍTULO II. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LAS QUITINASAS CHIT33 Y CHIT42, DE <i>T. harzianum</i>, EN PLANTAS DE TABACO	119
INTRODUCCIÓN II	121
1. LOS MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS	123
2. DAÑO GENERADO POR EL ESTRÉS EN LAS PLANTAS	124
2.1. EL ESTRÉS BIÓTICO	124
2.1.1. El reconocimiento entre la planta y el patógeno: Hipótesis gen a gen	125
2.1.2. Los mecanismos de defensa frente al estrés biótico	127
2.1.2.1. La respuesta hipersensible (HR)	127
2.1.2.2. Formas activas de oxígeno o formas ROS. El daño tóxico	128
2.1.2.3. Engrosamiento de la pared celular	130
2.1.2.4. Síntesis de compuestos antimicrobianos	130
2.1.2.5. Activación génica. Síntesis de proteínas de respuesta a patógeno (PR)	130
2.1.2.6. La respuesta sistémica adquirida o SAR	131
2.1.3. Las quitinasas vegetales	131
2.1.4. Las peroxidasas vegetales	134
2.2. EL ESTRÉS ABIÓTICO	135
2.2.1. Estrés por metales pesados	136
2.2.1.1. Mecanismo de acción de los metales pesados	136

2.2.1.2. Mecanismos naturales de detoxificación	137
2.2.2. Estrés salino y osmótico	138
2.2.2.1. El daño generado por el estrés salino y osmótico	138
2.2.2.2. Mecanismos naturales de protección	139
2.3. INTERCONEXIÓN ENTRE LAS RUTAS DE RESPUESTA AL ESTRÉS ABIÓTICO Y BIÓTICO	140
3. LOS ELICITORES EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA	141
4. MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS FRENTE A ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR ESTRÉS	142
4.1. PLANTAS DE TABACO PORTADORAS DE LAS QUITINASAS CHIT33 y CHIT42 DE <i>T. harzianum</i>	143
RESULTADOS II	147
1. EXPRESIÓN DE LA QUITINASA CHIT33 EN PLANTAS DE TABACO	149
1.1. OBTENCIÓN DE LAS PLANTAS psCHIT33	149
1.2. ANÁLISIS NORTHERN DE LAS PLANTAS psCHIT33	150
1.3. ANÁLISIS WESTERN DE LAS PLANTAS psCHIT33	151
1.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINASA DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS psCHIT33	152
2. EXPRESIÓN SIMULTÁNEA DE LAS QUITINASAS CHIT33 Y CHIT42 EN PLANTAS DE TABACO. OBTENCIÓN DE PLANTAS psCHIT33x42	153
2.1. POLINIZACIÓN DE PLANTAS psCHIT33. OBTENCIÓN DE LA F ₀	153
2.2. ANÁLISIS NORTHERN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS	153
3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS psCHIT42, psCHIT33 Y psCHIT33x42	154
3.1. ENSAYOS DE RESISTENCIA FRENTE A ESTRÉS BIÓTICO	156
3.1.1. Ensayos de resistencia de germínulas frente al hongo fitopatógeno <i>R.</i> <i>solani</i>	156
3.1.2. Ensayos de resistencia de plantas adultas frente a la bacteria fitopatógena <i>P. syringae</i> pv <i>tabaci</i>	157
3.1.2.1. Permanencia del patógeno en la planta	158
3.1.2.2. Cinética de la actividad peroxidasa	159
3.1.2.3. Expresión de genes de respuesta a patógeno (PR)	161
3.1.2.4. Desarrollo del área necrótica en la zona de infección	162
3.2. ENSAYOS DE RESISTENCIA A ESTRÉS ABIÓTICO	164
3.2.1. Ensayos de resistencia a estrés salino	164
3.2.2. Ensayos de resistencia a metales pesados	167
DISCUSIÓN II	173
CAPÍTULO III. CLONACIÓN Y REGULACIÓN DEL GEN <i>gla66</i> DE <i>Trichoderma harzianum</i>	179
INTRODUCCIÓN III	181
1. LOS HONGOS AMILOLÍTICOS	183
2. ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN	183
3. EL COMPLEJO AMILOLÍTICO. POSIBLES APLICACIONES	184

4. GLUCOAMILASAS: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y LOCALIZACIÓN	186
4.1. ESTRUCTURA DE LAS GLUCOAMILASAS. ISOENZIMAS	186
4.1.1. Isoenzimas	189
4.2. LOCALIZACIÓN DE LAS GLUCOAMILASAS	189
4.3. FUNCIÓN DE LAS GLUCOAMILASAS	190
5. EL SISTEMA AMIOLÍTICO DE <i>Trichoderma</i>	191
6. REGULACIÓN DEL COMPLEJO AMIOLÍTICO DE HONGOS	191
7. REGULACIÓN POSTTRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR uORFs	193
7.1. INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS	193
7.2. REGULACIÓN MEDIADA POR uORFs Y uAUGs	193
7.2.1. Modo de acción de las uORFs y uAUGs.	193
7.2.2. Variables que afectan a la función de la uORF	194
7.2.3. Casos descritos en hongos	196
7.3. MECANISMOS ALTERNATIVOS A LOS MEDIADOS POR LAS uORFs	198
RESULTADOS III	199
1. BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL	201
1.1. GENES EXPRESADOS BAJO ESTRÉS NUTRICIONAL Y PRESENCIA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	201
2. ANÁLISIS DE UN GEN DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL: <i>gla66</i>	203
2.1. OBTENCIÓN DEL CLON DE cDNA DE <i>gla66</i>	203
2.2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL GEN <i>gla66</i>	204
2.3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>gla66</i>	205
3. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA GLA66	207
3.1. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA	207
3.2. HOMOLOGÍA CON OTRAS PROTEÍNAS	208
3.3. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCIARIA DE GLA66	210
4. ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN <i>gla66</i>	212
4.1. CLONACIÓN DEL DNA GENÓMICO DE <i>gla66</i>	212
4.2. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA PROMOTORA	213
5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>gla66</i>	215
5.1. EFECTO EJERCIDO POR LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA EXPRESIÓN DE <i>gla66</i>	215
5.1.1. Análisis de extractos intracelulares y extracelulares	217
5.2. EFECTO EJERCIDO POR EL ESTRÉS SOBRE LA EXPRESIÓN DE <i>gla66</i>	218
5.3. REGULACIÓN POSTTRANSCRIPCIONAL DE <i>gla66</i>	220
5.3.1. Análisis de de los transcritos generados a partir de <i>gla66</i>	220
5.3.2. Regulación posttranscripcional mediada por uORF	221
6. EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE <i>gla66</i> EN <i>T. harzianum</i> CECT 2413	224
6.1. COTRANSFORMACIÓN DE <i>T. harzianum</i> CON LOS VECTORES pLMRS3- <i>gla66</i> Y p3SR2	224
6.2. ANÁLISIS DE LOS TRANSFORMANTES	225
DISCUSIÓN III	231
CONCLUSIONES	237

ÍNDICE DE FIGURAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 1. Proceso de ligación en el vector pCR [®] 4-TOPO	26
Figura 2. Situación de los cebadores sobre la 5' UTR	37
Figura 3. Esquema del vector Uni-ZAP XR	70

CAPÍTULO I

Figura I.1. Mecanismo de acción de las quitinasas en <i>Trichoderma</i>	87
Figura I.2. Esquema del clon utilizado para el aislamiento del promotor del gen <i>chit33</i>	97
Figura I.3. Obtención de la construcción pSK- <i>pchit33</i>	98
Figura I.4. Secuencias reguladoras putativas halladas en <i>pchit33</i>	99
Figura I.5. Obtención del vector pZEGA33	100
Figura I.6. Obtención del vector pMDJ1	101
Figura I.7. Estabilización de los transformantes	102
Figura I.8. Análisis Southern de la cepa silvestre y de las portadoras de los genes <i>gfp</i> y <i>goxA</i>	104
Figura I.9. Efecto de la fuente de carbono y su concentración sobre la expresión de <i>chit33</i> .	105
Figura I.10. Efecto de la fuente de carbono en la expresión de <i>ppchit33::gfp</i>	107
Figura I.11. Ensayos de confrontación	109
Figura I.12. Efecto de la fuente de carbono y su concentración en la expresión de <i>pchit33::goxA</i>	111
Figura I.13. Efecto del estrés térmico sobre la expresión de <i>pchit33::goxA</i>	112

CAPÍTULO II

Figura II.1. Esquema de los mecanismos de defensa de la planta en una interacción incompatible	125
Figura II.2. Fluorescencia característica de la HR	128
Figura II.3. Estructura de las quitinasas de plantas	132
Figura II.4 Ruta de transducción general frente a condiciones de frío, sequía y estrés salino en plantas	139
Figura II.5. Ruta de transducción de señales del estrés salino	140
Figura II.6 Representación esquemática de algunas rutas de respuesta a estrés y defensa en las que intervienen los factores de transcripción ERF	142
Figura II.7. Construcciones realizadas para la obtención de las plantas transgénicas portadoras de las quitinasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	149
Figura II.8 Análisis northern de las plantas psCHIT33	150
Figura II.9. Detección de la proteína CHIT33 en extractos proteicos totales de las plantas psCHIT33	151
Figura II.10. Actividad quitinasa presente en las diferentes líneas psCHIT33	152
Figura II.11 Northern de las plantas cruce	154
Figura II.12. Efecto generado por <i>R. solani</i> en dos líneas transgénicas	156

Figura II.13. Diseño experimental realizado en las plantas de tabaco frente a <i>P. syringae</i> pv <i>tabaci</i>	158
Figura II.14. Permanencia de <i>P. syringae</i> pv <i>tabaci</i> en el tejido foliar	159
Figura II.15. Cinética de la actividad peroxidasa de las líneas psCHIT33, psCHIT42, psCHIT33x42 y Bin19	160
Figura II.16. Cinética de la expresión de los genes correspondientes a las proteínas PR	162
Figura II.17. Desarrollo del área necrótica típica de la respuesta hipersensible en tabaco por el patógeno <i>P. syringae</i> pv <i>tabaci</i>	163
Figura II.18. Daño generado por el estrés salino (256 mM de NaCl) sobre las germínulas de las plantas psCHIT33, psCHIT42, psCHIT33x42 y plantas control Bin19	165
Figura II.19. Ensayo de resistencia frente al estrés salino	166
Figura II.20. Daño generado por metales pesados (300 µM) sobre las germínulas de tabaco portadoras de las quitinasas y control (Bin19)	168
Figura II.21. Efecto de los metales pesados sobre las distintas líneas transgénicas	169-170

CAPÍTULO III

Figura III.1. Estructura del almidón	183-184
Figura III.2. Mecanismo de acción de las principales enzimas amilolíticas	185
Figura III.3. Evolución de la glucoamilasas	188
Figura III.4. Localización de la glucoamilasa codificada por el gen <i>glaA</i> de <i>A. niger</i>	190
Figura III.5. Disposición de las uORFs en un transcrito eucariótico	193
Figura III.6. Mecanismos de acción de las uORFs	195
Figura III.5. Mecanismo de acción de las IRES	198
Figura III.6. Gel de <i>Differential Display</i>	201
Figura III.7. Micelio de <i>T. harzianum</i> tras 8 h de inducción	202
Figura III.8. Northern de los clones aislados por <i>Differential Display</i>	203
Figura III.9. Mapa de restricción del vector pSK- <i>gla66</i>	204
Figura III.10. Análisis Southern del gen <i>gla66</i> de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	204
Figura III.11. Secuencia del cDNA correspondiente al gen <i>gla66</i>	206
Figura III.12. Perfil de hidrofobicidad de las proteínas codificadas por <i>gla66</i>	207
Figura III.13. Alineamiento de la secuencia de la proteína GLA66 con glucoamilasas homólogas presentes en los bancos de secuencias	209
Figura III.14. Estructura de la glucoamilasa GLA66	210
Figura III.15. Modelo tridimensional de GLA66	211
Figura III.16. Obtención del clon de gDNA correspondiente a <i>gla66</i>	212
Figura III.17. Secuencia promotora del gen <i>gla66</i>	214
Figura III.18. Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de <i>gla66</i>	216
Figura III.19. Análisis western de los extractos intra y extracelulares	218
Figura III.20. Expresión de <i>gla66</i> bajo condiciones de estrés	219
Figura III.21. Cinética de expresión de <i>gla66</i>	220
Figura III.22. Orígenes de transcripción en <i>gla66</i>	221
Figura III.23. Pasos seguidos en el subclonaje de las distintas versiones de la región líder del transcrito LT en el vector puY1	222

Figura III.24. Análisis cuantitativo del efecto generado por las uORFs del transcrito LT.	223
Figura III.25. Vectores utilizados en la cotransformación de <i>T. harzianum</i> , para la expresión constitutiva de <i>gla66</i>	224
Figura III.26. Análisis Southern de los transformantes estables portadores de los vectores pLMRS3- <i>gla66</i> y p3SR2	225
Figura III.27. Análisis northern de las cepas transformantes portadoras de la construcción pLMRS3- <i>gla66</i>	226
Figura III.28. Análisis western de las cepas transformantes portadoras de la construcción pLMRS3- <i>gla66</i>	226

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo	15
Tabla 2. Cepas de hongos filamentosos utilizadas en este trabajo	16
Tabla 3. Características de las enzimas de alta fidelidad	34
Tabla 4. Cebadores diseñados para la mutagénesis dirigida	36
Tabla 5. Cebadores utilizados para la técnica de RACE-RLM	81

CAPÍTULO I

Tabla I.1. El sistema quitinolítico de <i>T. harzianum</i> (basado en Lorito, 1998)	89
---	----

CAPÍTULO II

Tabla II.1. La hipótesis gen a gen considerando dos parejas de genes <i>Avr/R</i>	126
Tabla II.2. Genes <i>Avr</i> de origen fúngico	127
Tabla II.3. Funciones de las quitinasas vegetales y procesos en los que intervienen	133
Tabla II.4. Genes de las principales peroxidasas de plantas	135
Tabla II.5. Porcentaje de identidad de CHIT42 y CHIT33 con otras proteínas	144
Tabla II.6. Líneas seleccionadas de plantas psCHIT42, psCHIT33 y psCHIT33x42, para los ensayos de estrés abiótico y biótico	155
Tabla II.7. Porcentaje de supervivencia de las germinulas frente a <i>R. solani</i>	156

CAPÍTULO III

Tabla III.1 Función de las enzimas amilolíticas de origen fúngico	186
Tabla III.2 Ejemplos de genes portadores de uORFs en <i>S. cerevisiae</i>	196
Tabla III.3. Secuencia consenso para el inicio de la traducción	205
Tabla III.4. Homología a nivel de DNA (A) y proteína (B) de <i>gla66</i> según la base de datos BLAST	208
Tabla III.5. Porcentajes de identidad y similitud de GLA66 con otras glucoamilasas	210
Tabla III.6. Construcciones realizadas con la región 5'-UTR del transcrito LT de <i>gla66</i>	222
Tabla III.7. Actividad glucoamilasa de las cepas transformantes para <i>gla66</i>	226

amp	ampicilina
cDNA	DNA complementario
cfu	unidades formadoras de colonias
cm ²	centímetro(s) cuadrado(s)
d	densidad
dNTPs	deoxinucleótidos 5'-trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilén-diamino-tetracético
g	gramo(s)
GFP	green fluorescent protein
GOX	glucosa oxidasa
GST	glutación-S-transferasa
h	hora(s)
Hr	humedad relativa
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kan	kanamicina
kb	kilobase
kDa	kilodalton(s)
l	litro
LUC	luciferasa
M	molar
MES	ácido (2-[N-morfolino] etanosulfónico)
mg	miligramo(s)
μg	microgramo(s)
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
μl	microlitro(s)
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-(morfolino) propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
ms	milisegundo(s)
N	normal
ng	nanogramo(s)
nt	nucleótido
°C	grado(s) centígrado(s)
OD	densidad óptica
ORF	pauta abierta de lectura (open eading frame)
p	peso
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
pI	punto isoeléctrico
RACE	amplificación rápida de los extremos de cDNA (rapid amplification of cDNA ends)
RNA	ácido ribonucléico
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
s	segundo(s)
S ₆₅	residuo de serina de la posición 65

SA	ácido salicílico
SDS	dodecil sulfato sódico
T	temperatura
TA	temperatura ambiente
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metil-etilén diamina
U	unidad(es)
v	volumen
V	voltio
V _f	volumen final
w	watio

Introducción General

1. EL GÉNERO *Trichoderma*

El género *Trichoderma* engloba a un conjunto de especies de hongos filamentosos imperfectos (Deuteromicetos) que se caracterizan por poseer un rápido crecimiento, conidios de pigmentación verdosa y conidióforos de estructura mal definida (Samuels, 1996).

Se consideran Deuteromicetos por carecer de ciclo sexual conocido, aunque existe una estrecha relación con géneros pertenecientes al orden Hypocreales, que posee ciclo sexual. Samuels y colaboradores (2002), identificaron especies pertenecientes al género *Hypocrea* como formas anamórficas de *Trichoderma*. Esta relación estrecha ha sido bien estudiada en el caso de *H. lixii* y *T. harzianum* (Chaverri *et al.*, 2003), y en el de *H. jecorina* con *T. reesei* (Kuhls *et al.*, 1996). Por tanto, podría decirse que las especies del género *Trichoderma* son derivados clonales del género *Hypocrea*, que han perdido la capacidad de realizar ciclo sexual.

La primera **clasificación** morfológica se debe a Rifai (1969), aunque posteriormente se realizaron estudios más detallados. Hoy en día, la taxonomía sigue precisándose dentro de este género. Para ello, se han unido a las técnicas tradicionales estudios sobre los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* (Okuda *et al.*, 1982); las características fisiológicas de este género; los perfiles de las isoenzimas que produce (Leuchtmann *et al.*, 1996); y los datos moleculares obtenidos, como las secuencias obtenidas a partir de las ITS rDNA (internal transcribed spacers ribosomal DNA) y las técnicas de “finger-printing” (Fujimori y Okuda, 1994; Kuhls *et al.*, 1997) desarrolladas, entre otras.

En cuanto a la **morfología**, el micelio de *Trichoderma* está constituido por hifas generalmente ramificadas, divididas en su interior por septos con poros. Las células contienen múltiples núcleos, que se hallan dispersos en el citoplasma, si la hifa es joven, o formando grupos en el caso contrario, debido a la existencia de múltiples vacuolas en el interior de ésta (Harman *et al.*, 1993).

Respecto al **genoma** de *Trichoderma*, es relativamente pequeño y con un tamaño estimado de 31-39 Mb. El número de cromosomas oscila entre 3 y 7 (Mäntylä *et al.*, 1992; Herrera-Estrella *et al.*, 1993), dándose con frecuencia el fenómeno de polimorfismo. Parece ser que la variación en el tamaño y número de los cromosomas, es común en aquellos hongos que se reproducen asexualmente y podría deberse a mutaciones o fenómenos de integración inducidos por situaciones de estrés, como choque térmico o carencia de nutrientes (Gómez *et al.*, 1997).

Con relación al **ciclo de vida**, el microorganismo crece y se ramifica desarrollando hifas de 5 a 10 μm de diámetro. El fenómeno de esporulación, en este caso asexual, genera abundantes conidios unicelulares, de un diámetro aproximado entre 3-5 μm y generalmente de color verde. Las esporas se sitúan sobre estructuras muy ramificadas denominadas conidióforos, que a su vez descansan sobre células llamadas fiálidas. También se generan otro tipo de propágulos intercalados en el micelio, en condiciones nutricionales adversas o de desecación. Estos últimos, llamados clamidosporas, suelen ser unicelulares aunque pueden llegar a fusionarse entre sí (Lewis & Papavizas, 1984).

En cuanto a su **ecología**, el género *Trichoderma* es característico del suelo y es capaz de utilizar diversos sustratos, de crecer rápidamente e incluso de resistir a productos químicos nocivos. Su distribución abarca numerosas zonas geográficas, las cepas han sido aisladas de ecosistemas tan distintos como bosques, áreas agrícolas, desiertos, jardines, marismas y playas, entre muchos otros (Danielson & Davey, 1973; Roiger *et al.*, 1991). Su desarrollo se ve favorecido en suelos ácidos, siendo el

crecimiento menos efectivo en sustratos neutros o básicos. Aunque la temperatura y la humedad son factores críticos para su germinación, en realidad los nutrientes constituyen el factor limitante para la germinación de los propágulos. Los miembros del género *Trichoderma* suelen ser dominantes en la comunidad fúngica del suelo y se consideran generalmente como descomponedores de biomasa o saprófitos, lo cual contribuye a mejorar la fertilidad del terreno. Además incluyen especies parásitas de otros hongos, como ocurre en el caso del champiñón, dañado por la acción de *T. aggressivum* (Samuels *et al.*, 2002), que genera importantes pérdidas en Europa y Norteamérica.

Respecto a la **nutrición**, las especies del género *Trichoderma* poseen la capacidad de degradar una amplia variedad de polisacáridos, como la hemicelulosa y la celulosa; y, del mismo modo, polímeros relacionados como la quitina. Dentro de las fuentes de carbono asimilables, se consideran óptimas la glucosa, la fructosa, la manosa, la galactosa, la trealosa, la xilosa y la celobiosa. No obstante, las especies de *Trichoderma*, generalmente, son incapaces de utilizar el metanol, el etanol y el ácido láctico como fuentes de carbono. Sustratos como la lactosa, la maltosa y el almidón, se utilizan dependiendo de la especie. (Kubicek-Pranz, 1998). En cuanto al nitrógeno, el amonio normalmente es mejor fuente que el nitrato, ya que existen especies que carecen de nitrato permeasa (Kubicek, datos no publicados). Además, la capacidad de metabolizar peptona, alanina, aspártico, glutámico, y determinadas bases nitrogenadas, como las purinas, le permite obtener nitrógeno a partir de otros recursos.

En cuanto a las posibles **aplicaciones**, dentro del género *Trichoderma*, hay especies muy útiles para la producción industrial de enzimas y para el control biológico, como es el caso de la cepa utilizada en el presente trabajo: *T. harzianum* CECT 2413. En la aplicación primera, destaca *T. reesei*, cuyas enzimas se utilizan en la industria textil, en la alimenticia y en la del papel. Las enzimas de mayor aplicación obtenidas a partir de este microorganismo son las celulasas, útiles para la sacarificación del material celulósico, la maceración de tejidos vegetales y la consiguiente obtención de zumo de frutas y aromas, la mejora en la manufactura del vino y del aceite de oliva, el tratamiento de la tela vaquera (lavado a la piedra) e incluso la mejora de la apariencia de las prendas, añadiendo el preparado enzimático al detergente, entre otras aplicaciones (Galante *et al.*, 1998). Por otra parte, el género *Trichoderma* se utiliza como factoría de proteínas heterólogas; principalmente *T. reesei*, gracias a su enorme capacidad secretora. De esta manera se ha obtenido interleucina-6 de mamíferos e incluso anticuerpos de cadena sencilla procedentes de ratón (Penttilä, 1998).

El uso industrial de *Trichoderma* comenzó en los años 80, con mutantes superproductores de celulasas. En un principio, se mejoró el rendimiento de la producción proteica modificando los parámetros del cultivo. La mutagénesis clásica, mediante rayos X, rayos UVA, mutágenos químicos, etc., permitió aislar y seleccionar aquellos mutantes que, tras el escrutinio pertinente, mostraban una mayor capacidad secretora. Posteriormente, mediante recombinación asexual (parasexual), se consiguió incrementar la producción enzimática; la fusión de protoplastos permitió obtener cepas superproductoras de celulasas. Actualmente, la mejora se realiza mediante ingeniería genética (Mach & Zeilinger, 2003). Se han conseguido así rendimientos de hasta decenas de gramos de proteína homóloga o heteróloga por litro. La obtención de recombinantes estables se consigue gracias a la integración en el genoma del DNA con el que se transforma. Normalmente, los transformantes no difieren significativamente de la cepa silvestre, si bien a veces presentan un porcentaje de ramificación mayor en las hifas. Con respecto a la mutación tradicional, el uso de vectores de expresión para la obtención de transformantes supone un avance; pues permite acotar la producción de

proteína, consiguiendo por tanto, perfiles proteicos más concretos (Mäntylä *et al.*, 1998).

2. EL GÉNERO *Trichoderma* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Desde hace más de 70 años, se ha investigado el papel de numerosas cepas de *Trichoderma* como agentes de control biológico (Samuels, 1996), aunque sólo recientemente se han comercializado algunas de ellas. En este comercio ha influido la preocupación social acerca de los efectos medioambientales originados por el uso de pesticidas químicos.

El control biológico ejercido por este género abarca aspectos diferentes: por una parte, existe una interacción con especies fitopatógenas, reduciendo su presencia y por tanto el daño que ocasionan; por otra, puede existir una interacción con la planta que potencie su crecimiento y active sus sistemas de defensa (Ousley *et al.*, 1993). Las interacciones que ocurren entre *Trichoderma* y otros microorganismos son complejas, en ellas intervienen la competición por los nutrientes, la acción de enzimas líticas, la antibiosis, la simbiosis y la fungistasis. Principalmente, las cepas relacionadas con el biocontrol son micoparásitas, aunque también se han descrito especies que parasitan nematodos como *Meloidogyne javanica* (Parveen *et al.*, 1993), por lo que pueden utilizarse de igual modo para el control de enfermedades.

Como se mencionó anteriormente, la caracterización genética del género está todavía incompleta y su clasificación morfológica es insuficiente; pero cuenta con características que lo convierten en un candidato atractivo para su aplicación en el control biológico. Por una parte, posee una gran capacidad de adaptación ecológica, como refleja su amplia distribución medioambiental (Roiger *et al.*, 1991); y por otra, su cultivo resulta fácil y factible sobre sustratos económicos.

Las especies de *Trichoderma* que se utilizan normalmente para el control biológico, no se incluyen en el género *Hypocrea* (Ascomicetos), por lo que son especies que generan sólo esporas asexuales. La clasificación taxonómica tradicional, basada en las diferencias morfológicas y principalmente en las correspondientes a las estructuras asexuales de esporulación, ha sido revisada y completada actualmente con técnicas moleculares (Harman, 2000). Así pues, las especies pertenecientes a *T. harzianum* Rifai (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae), que constituyen las cepas implicadas en control biológico, se han clasificado de la siguiente manera (Hermosa *et al.*, 2000): *T. harzianum* s. str., *T. inhamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride* y *T. asperellum*.

2.1. INTERACCIONES CON OTROS HONGOS

Las cepas de *Trichoderma* consideradas como agentes potenciales de control, ejercen su acción frente a un amplio abanico de fitopatógenos, entre ellos hallamos los géneros: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Fusarium*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Monilia*, *Nectria*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Venturia*, *Verticillium*, y hongos de la podredumbre de la madera (Grondona *et al.*, 1997; Monte, 2001).

Las especies implicadas en el biocontrol, parasitan activamente a los hongos fitopatógenos, por ello se dice que son antagonistas. Un antagonista ideal controlaría a

todos los patógenos de plantas, pero no afectaría negativamente al resto de especies saprofitas y a las micorrizas del ecosistema. Se han realizado estudios en los que se demuestra que la interferencia generada por *Trichoderma* sobre los microorganismos generadores de micorrizas, difiere según la especie utilizada (de Boer *et al.*, 2003). En el caso de la formación de micorriza por *Glomus mosseae*, se ha demostrado que *T. aureoviride* promueve la formación; mientras que *T. harzianum* afecta de forma negativa, quizás por la inducción de la síntesis de fitoalexinas en la raíz de la planta (Wyss *et al.*, 1992).

El **antagonismo** comprende fundamentalmente tres mecanismos: **antibiosis**, **micoparasitismo** y **competición**. No son mutuamente excluyentes, ya que estudios recientes han demostrado que determinados antibióticos y enzimas hidrolíticas producidos por el microorganismo, pueden actuar sinérgicamente (Di Pietro *et al.*, 1993; Fogliano *et al.*, 2002; Woo *et al.*, 2002).

2.1.1. Antibiosis

Este término se refiere a la producción de por *Trichoderma* de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el crecimiento de otros microorganismos, aunque no estén en contacto. El medio influye cuantitativa y cualitativamente en la producción de las sustancias inhibitorias o antibióticos. Inicialmente, por la confusión taxonómica existente entre los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*, no se determinaron claramente los antibióticos producidos por cada uno de ellos. La primera caracterización de estos compuestos en *Trichoderma* fue descrita por Dennis & Webster (1971). Posteriormente se realizaron clasificaciones más específicas, como la referida a los inhibidores volátiles generados por la especie *T. virens* (Maiti *et al.*, 1991). Los antibióticos pueden actuar de forma sinérgica con enzimas hidrolíticas de pared celular (Cell Wall Degrading Enzymes, CWDE) producidas por el microorganismo, potenciando su efecto antagónico (Di Pietro *et al.*, 1993; Schrimbock *et al.*, 1994; Lorito *et al.*, 1996).

2.1.2. Micoparasitismo

Se define como el ataque directo de un hongo sobre otro (Chet, 1987). En el caso de *Trichoderma* spp, en la interacción directa con el hongo parasitado se distinguen cuatro fases (Chet, 1990): (a) **Crecimiento quimiotáctico**, donde el hongo antagonista es atraído por un estímulo químico generado por el organismo diana, dándose una ramificación atípica hacia el huésped. (b) **Reconocimiento específico**, que puede ser físico o químico, en el que están implicadas interacciones hidrofóbicas entre moléculas complementarias de ambas paredes celulares. En el caso de *T. harzianum* y *R. solani*, se ha demostrado que el reconocimiento está mediado por una interacción lectina-carbohidrato (Elad *et al.*, 1983). (c) **Adhesión** al hospedador mediante la formación de estructuras en forma de gancho y/o apresorios (Elad *et al.*, 1983), y posterior enrollamiento alrededor de sus hifas. (d) **Lisis celular**, donde la pared celular del hongo parasitado se degrada por la acción de enzimas, principalmente quitinasas, proteasas y glucanasas, producidas por el hongo antagonista, el cual termina introduciéndose por los orificios generados para aprovechar el contenido intracelular (Elad *et al.*, 1982; Elad *et al.*, 1984; Geremia *et al.*, 1993).

2.1.3. Competición

Como organismo saprófito, *Trichoderma* está adaptado biológicamente para colonizar sustratos que le proporcionen **nutrientes** y, en ausencia de estos, para permanecer en estado quiescente en forma de conidios o clamidosporas. De este modo, existe una competencia activa por los recursos con el resto de los microorganismos que componen el ecosistema. En el caso de *Botrytis* y *Sclerotinia* spp, por ejemplo, existe una competencia directa por tejidos necrosados o senescentes que sirven de fuente nutritiva. Los patógenos aprovechan la existencia de tejido muerto en la planta para, a partir de éstos, invadir los tejidos sanos. Se han descrito casos donde la aplicación de *Trichoderma* ha inhibido el desarrollo de otros patógenos por colonización competitiva (Dubos *et al.*, 1987).

Por otra parte, la competición puede darse por **exudados vegetales**, que en algunos casos se han descrito como estimuladores de la germinación de esporas; y por las heridas que se produzcan en la planta, pues constituyen lugares de entrada para el hongo, así como puntos de liberación de nutrientes (Harman & Nelson, 1994).

2.2. INTERACCIONES CON PLANTAS

Los microorganismos que crecen cercanos a las raíces de las plantas pueden influir en el crecimiento y desarrollo de éstas. Tal es el caso, por ejemplo, de las micorrizas, que son hongos que promueven el crecimiento vegetal en numerosas especies, gracias a que facilitan la toma de agua y nutrientes del medio, debido a la colonización simbiótica de sus raíces (Reid, 1990). La interacción *Trichoderma*-planta es más compleja en presencia de endomicorrizas simbióticas.

La interacción de *Trichoderma* con las plantas puede resultar beneficiosa o perjudicial (Bailey & Lumsden, 1998).

2.2.1. Efectos negativos sobre el crecimiento

La inhibición del crecimiento vegetal, puede ser debida a la producción de **compuestos fitotóxicos**, como la gliotoxina y la viridina, por parte de *Trichoderma*. Ambos han sido descritos como inhibidores de la germinación y del crecimiento. Generalmente actúan mejor a bajo pH, quizás porque presentan mayor estabilidad. Otro de los compuestos generados es el viridiol, un dihidroderivado de la viridina, que resulta tóxico para un amplio abanico de especies vegetales.

Por otra parte, se han descrito enfermedades causadas por *Trichoderma* en determinadas especies vegetales; entendiéndose por enfermedad, cualquier alteración que interfiera en su estructura normal, su función o su valor económico (Agrios, 1988). Determinados aislados de *T. viride* han sido descritos como dañinos para la alfalfa, por estimular además la patogenicidad de otros hongos. También en el caso de *T. viride* se ha descrito un aislado que resultó ser **patógeno leve** en cultivos hidropónicos de calabaza, pimiento y tomate; entendiéndose como patógeno leve aquel saprofito o parásito que daña sólo las células meristemáticas o corticales, y que vive en el suelo como microorganismo saprofito, en forma de esclerocios o de esporas.

2.2.2. Efectos positivos sobre el crecimiento

A diferencia de lo mencionado anteriormente, se observó que *Trichoderma* podía promover el crecimiento de las plantas. Aunque los primeros estudios realizados *in vitro* demostraron que favorecía la germinación, aceleraba la floración e incrementaba el peso fresco en especies como el pimiento y el crisantemo, la ausencia de los patógenos de la rizosfera en los ensayos, no permitía concluir definitivamente la existencia de un efecto beneficioso para la planta. No obstante, con posterioridad, se realizaron ensayos donde las condiciones se asemejaban bastante a las existentes en la naturaleza. En 1989, Harman observó en ensayos de campo que el aislado de *T. harzianum* T12 generaba un efecto positivo sobre el maíz al incrementar su peso seco, incluso en presencia del patógeno *Pythium ultimum*. Por otra parte, se ha propuesto que *Trichoderma* interviene asimismo en la solubilización de fosfatos y micronutrientes del suelo, beneficiando el crecimiento de la especie vegetal (Altomare *et al.*, 1989).

Además, la **competencia por la rizosfera** ejercida por *Trichoderma*, puede desplazar a otros organismos dañinos para la especie vegetal (Harman, 1992). Aunque la mayoría de las especies del género tienen una capacidad limitada para colonizar la rizosfera (Papavizas, 1985), se han aislado algunas cepas con cierta habilidad para ello (Sivan & Chet, 1989). No obstante, se han fusionado estirpes distintas que han originado otras nuevas con mayor capacidad colonizadora que las cepas parentales (Harman *et al.*, 1989)

Es importante discernir si el efecto positivo que ejerce *Trichoderma* es indirecto, debido a la acción que ejerce sobre los patógenos del suelo, o si por el contrario, es directo sobre la planta. Un efecto indirecto es el descrito anteriormente sobre las especies del género *Pythium*, patógenos minoritarios del suelo (Harman *et al.*, 1989).

En cuanto a las acciones directas sobre el material vegetal, se han realizado estudios que demuestran que *Trichoderma* limita y elimina los daños producidos por la presencia de un **estrés oxidativo**, al reducir la presencia de formas activas de oxígeno y consecuentemente los niveles de enzimas antioxidativas (catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa) en el tejido (Lapsker & Elad, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que ciertas especies de este género promueven la **resistencia inducida** en la planta con la que interacciona, al activar sus sistemas de defensa. Esto ocurre gracias a la liberación de moléculas que pueden proceder del patógeno o bien surgir a raíz del contacto entre ambos (Boller, 1989). Tal es el caso del aislado *T. harzianum* T39, que reduce la enfermedad producida por *B. cinerea* en la hoja de judía al inhibir la enzima pectolítica del patógeno (Zimand *et al.*, 1996); los oligogalacturónidos acumulados debido a la reducción en la actividad poligalacturonasa, podrían actuar como elicitores del sistema.

Por otro lado, también se ha descrito que la xilanasa de 22 kDa producida por *T. viride*, *T. hamatum* y *T. virens* induce de igual modo los sistemas de defensa en la especie *N. tabaccum* var Xathi (Sharon *et al.*, 1993). Entre los mecanismos activados está la síntesis de etileno (Fuchs *et al.*, 1989), la síntesis de proteínas en respuesta a patógeno o proteínas PR (Lotan & Flurh, 1990) y la canalización de iones K^+ , H^+ y Ca^{2+} (Bailey *et al.*, 1992). En este caso no parece que la xilanasa active el sistema de defensa por su función enzimática en sí, sino por su interacción con receptores de membrana, existentes en el tejido vegetal (Sharon *et al.*, 1993).

La capacidad que posee el género *Trichoderma* de colonizar la rizosfera y el tejido cortical de las raíces, junto con la de producir compuestos que estimulan la respuesta de defensa en la plantas, hace que las especies de este género sean excelentes candidatos para inducir la resistencia a fitopatógenos.

2.3. USOS POTENCIALES DE *Trichoderma* EN LA AGRICULTURA

Trichoderma genera tres tipos de **propágulos: hifas, clamidosporas y conidios**. Las hifas son estructuras extremadamente sensibles a la desecación, por lo que no resulta biomasa útil en los ensayos de biocontrol. Las clamidosporas en cambio, son capaces de sobrevivir en el suelo durante largos períodos (Lewis & Papavizas, 1983). Sin embargo presentan el inconveniente de que al menos son necesarias 2-3 semanas de fermentación para su obtención y de que sólo en torno al 8% son capaces de germinar. Por ello, los conidios son los propágulos más utilizados en los programas de biocontrol (Elad *et al.*, 1993). La conidiogénesis puede inducirse en *Trichoderma* alterando los niveles de nutrientes, principalmente generando déficit de fuente de C. La proporción C:N, resulta ser el factor clave en la viabilidad de la spora, obteniéndose los mejores resultados con una proporción 14:1 a pH 7.0 (Agosin & Aguilera, 1998).

Otros factores que favorecen y aceleran la producción de esporas son el choque nutricional, añadiendo un azúcar no asimilable, o la variación en la presión osmótica; la temperatura, el pH y el tiempo de cultivo y la luz. La aplicación de un choque térmico al final del proceso de esporulación mejora la calidad de los propágulos formados; probablemente por la acumulación de trealosa, un disacárido no reductor que protege específicamente a las proteínas y a las membranas en los estados de desecación. Además, aumenta la hidrofobicidad de la superficie celular, principalmente por el cúmulo de proteínas del tipo hidrofobinas, que contribuye favorablemente a la resistencia a la desecación (Agosin & Aguilera, 1998).

Una vez demostrada, *in vitro*, la capacidad de una cepa para ejercer control biológico, se procede a estudiar otros factores importantes antes de efectuar ensayos a gran escala. Esto es, debemos observar si el resultado *in vivo* es similar, teniendo en cuenta la tolerancia que presenta ante las condiciones medioambientales, la especificidad que presenta frente a la comunidad del ecosistema, el tiempo de permanencia, la compatibilidad con otros productos químicos añadidos y la manera de aplicación más efectiva. Actualmente ya se comercializan preparados basados en aislados de *Trichoderma*, como Bio-Fungus (Bélgica), que actúa frente un amplio rango de fitopatógenos, TUSAL (España) y *Trichoderma* 2000 (Israel), entre otros.

Es importante considerar la amplia variedad de **enzimas hidrolíticas** producidas por *Trichoderma*, que incluyen endoquitinasas, N-acetil- β -glucosaminidasas, quitin 1,4- β -quitobiosidasas, proteasas, endo- y exoglucan β -1,3-glucosidasas, endoglucan β -1,6-glucosidasas, lipasas, xilanasas, mananasas, pectinasas, pectin liasas, amilasas, fosfolipasas, RNAsas y DNAsas (Lorito, 1998). Particularmente útiles para aplicaciones en el biocontrol, resultan las quitinasas y las glucanasas, por su eficiencia en la hidrólisis de los polímeros de la pared celular de los hongos fitopatógenos, inexistentes en los tejidos vegetales (revisado por Viterbo *et al.*, 2002). Numerosos estudios han demostrado la capacidad que presentan las enzimas hidrolíticas o CWDEs purificadas de *Trichoderma*, en la inhibición del crecimiento micelial así como en la germinación de las esporas de fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Ustilago*, *Venturia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, y especialmente *Botrytis*. Las CWDEs son inocuas para animales y humanos y serían, por tanto, compuestos potenciales activos en los fungicidas de nueva generación (Benítez *et al.*, 1998).

A diferencia de las enzimas vegetales, las quitinasas y las glucanasas de *Trichoderma* no sólo degradan la pared celular inmadura de los extremos de las hifas, sino que también hidrolizan las estructuras complejas formadas por quitina y glucanos en las hifas maduras. Por otra parte, también actúan sobre la pared celular de esclerocios y clamidosporas. Por tanto, reducen la presencia del patógeno y limitan su dispersión.

La combinación de enzimas con actividades líticas diferentes puede generar **sinergismo** y, por tanto, un incremento en la capacidad antifúngica de éstas. El crecimiento de *Botrytis* se ve limitado cuando se añade una mezcla de exoquitinasa y β -1,3-glucanasa, purificadas a partir de *T. harzianum*, en cantidades de 1 ppm, comparables a las dosis efectivas de la mayoría de los fungicidas (Monte, 2001; Mora & Earle, 2001).

Otro aspecto a considerar es el planteamiento de un **control integrado**. La combinación de estrategias químicas y biológicas, se ha convertido en la apuesta actual para incrementar la resistencia frente a los patógenos. De hecho, el efecto inhibitorio de los fungicidas químicos puede potenciarse añadiendo pequeñas cantidades de CWDEs (10-20 ppm) procedentes de *Trichoderma*. Este fenómeno se ha descrito fundamentalmente con fungicidas del tipo azoles, benzimidazoles y pirimidinas. Otro de los aspectos abordados, ha sido la obtención de cepas mutantes con mayor resistencia a los fungicidas para su posterior uso (Ahmad & Baker, 1987; Rey, 1998, Tesis Doctoral).

Otra ventaja a tener en cuenta, es el sinergismo que presentan determinadas CWDEs de *Trichoderma* con algunas proteínas relacionadas con la patogénesis de plantas, como es el caso de las proteínas de respuesta a patógeno o PR. Esto podría promover su uso en forma de sprays foliares para potenciar así de forma natural los mecanismos de defensa de las plantas.

Pero quizás uno de los aspectos más importantes, en el planteamiento de los programas de control biológico, sea la consideración del género *Trichoderma* como **fuelle de genes**; no sólo para reforzar el efecto del biocontrol ejercido por el propio microorganismo, sino también para la obtención de plantas transgénicas en las que se potencien sus mecanismos de defensa. La expresión transgénica de quitinasas y glucanasas no afecta a la morfología, ni al desarrollo de la planta, ni tampoco interfiere en la formación de micorrizas, lo que supone una gran ventaja.

En los últimos años, numerosos trabajos han descrito el uso de genes de *Trichoderma* para la mejora del control biológico. La sobreexpresión de algunas de sus enzimas hidrolíticas contribuye a una mejora en el control sobre patógenos como *R. solani*, *Phytophthora cinnamoni* y *B. cinerea*. Por mutagénesis química se ha conseguido un mutante que produce tres veces más proteína que la cepa silvestre, reduciendo el daño causado por *B. cinerea* en la uva (Rey *et al.*, 2001). Por otro lado, la superproducción en *T. harzianum* CECT 2413 de enzimas homólogas como la quitinasa CHIT33 (Limón *et al.*, 1999), la quitinasa CHIT42 (Limón, 1999, Tesis Doctoral), la glucanasa BGN13.1 (Rincón & Benítez, 2000) y la glucanasa BGN16.2 (Delgado, 2001, Tesis Doctoral), mejoran el antagonismo ejercido por la cepa. La sobreexpresión de otro tipo de enzima, como la proteasa codificada por el gen *prb1* de *T. harzianum* IMI, potencia asimismo el biocontrol ejercido sobre los fitopatógenos (Flores *et al.*, 1997). También se ha descrito recientemente, el incremento en la capacidad lítica de cepas de *Trichoderma* que sobreexpresan una quitinasa (Baek *et al.*, 1999) y una β -1,4-glucanasa (Migheli *et al.*, 1998).

Otro aspecto a considerar en el progreso del biocontrol, es la expresión en plantas de genes que incrementen sus mecanismos de defensa. En la literatura, se encuentran numerosos casos en los que se aumenta la resistencia a fitopatógenos, mediante la expresión en el tejido vegetal de transgenes, procedentes de diversos microorganismos. Así pues, podemos mencionar la mejora que se realizó en plantas de patata frente a infecciones bacterianas, al expresar el gen de la lisozima del fago T4 (Düring, 1993). También se consiguió incrementar la resistencia del tabaco, frente al fitopatógeno *P. syringae*, al expresar una acetil transferasa de *Pseudomonas* (de la Fuente *et al.*, 1992) y una tionina de cebada (Carmona *et al.*, 1993). Por otro lado, se

logró aumentar la barrera frente a infecciones víricas en tabaco que sobreexpresaba proteínas defectuosas del virus patógeno, que interaccionaban con la replicación de este en la planta y con su desplazamiento por los tejidos vegetales (Baulcombe, 1996). Otro caso extensamente estudiado es el referido a la obtención de arroz transgénico. Actualmente se dispone de líneas totalmente resistentes al taladro (*Chilo suppressalis*), obtenidas mediante la introducción de los genes *cry1B* o *cry1A* de *Bacillus thuringiensis*, que codifican una endotoxina; o de inhibidores de proteasas, como el gen *mpi* del maíz (Messeguer, 2002). Actualmente se encuentra en vías de desarrollo la obtención de líneas de arroz resistentes a enfermedades fúngicas; para ello se está evaluando la eficacia de genes como el de la quitinasa *ChiA* de *Serratia* (Messeguer, 2002).

También *Trichoderma* ha sido fuente de genes para la obtención de plantas transgénicas, con el fin de potenciar sus mecanismos de defensa y de mejorar la producción vegetal. Trabajos previos han mostrado resultados positivos al expresar genes como el de la quitinasa CHIT42 de *T. harzianum* en patata y en tabaco, lo cual confirió resistencia frente a *R. solani* (Lorito *et al.*, 1998); o la quitinasa CHIT33 de *T. harzianum* en plantas de tabaco, que potenció los niveles basales de defensa (Cepeda *et al.*, 2000; Dana & Pintor-Toro, 2002). Por otro lado, se han realizado estudios con resultados prometedores, al expresar en fresa genes de *Trichoderma* que codifican determinadas proteínas antifúngicas. Los más positivos se han obtenido hasta el momento con la quitinasa CHIT42, que le confiere una mayor resistencia al fitopatógeno *Colletotrichum* (Yubero-Serrano *et al.*, 2002). Con el fin de obtener cepas más resistentes a las enfermedades fúngicas, la quitinasa CHIT42 y la glucanasa BGN16.2 de *T. harzianum*, se han expresado asimismo en plantas de melón y tomate (Vidigal-Duarte, 2001, Tesis Doctoral).

En este trabajo se ha considerado, entre sus objetivos, la expresión en plantas de tabaco de genes de *T. harzianum* CECT 2413 implicados en el micoparasitismo.

Materiales y Métodos

1. ORGANISMOS UTILIZADOS

1.1. BACTERIAS

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la siguiente tabla:

Estirpe y procedencia	Genotipo
<i>Escherichia coli</i> BL21 (Stratagene, LaJolla, U.S.A.)	B F <i>dcm ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal</i>
<i>E. coli</i> JM109 (Stratagene)	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK-mK+)supE44 relA1 Δ (lac-proAB) [F' traD36proAB lacIqZΔM15]</i>
<i>E. coli</i> LE392 (Promega, U.S.A)	F' <i>hsd 574</i> ($r_K^- m_K^-$) <i>supE44 supF58 lacY1 galK2 galT22 metB1 trpR55</i>
<i>E. coli</i> SOLR (Stratagene)	<i>e14⁻(mcrA) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 sbcC recB recJ umuC ::Tn5(kan^r) uvrC lac gyrA96 relA1 thiIendA1 λ^R [F'proAB, lacI^A ZΔM15] Su^r</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' (Stratagene)	<i>rec A1 end A1 gyr A96 thi hsd R17 sup E44 rel A1 lac [F' pro AB lac IqZDM15 Tn10 (tet^r)]</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tabaci</i> 153 (Dr. Pablo Rodríguez Palenzuela, E.T.S. Ingenieros Agrónomos de Madrid, España)	

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

1.2. LEVADURAS

La estirpe *S. cerevisiae* JDS+S (*Mata ura3-52 trp1Δ1 his4-38 leu2-1 rpb1-1*) utilizada en este trabajo, fue cedida amablemente por el Dr. John E. G. McCarthy, de la Universidad de Manchester, Reino Unido.

1.3. HONGOS FILAMENTOSOS

Las cepas de hongos filamentosos utilizadas en este trabajo se detallan en la siguiente tabla. La mayoría proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, Valencia).

Especie	Cepa	Procedencia
<i>Botrytis cinerea</i>	CECT 2100	Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia
<i>Rhizoctonia solani</i>	CECT 2815	Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia
<i>R. solani</i>	1450	Universidad de Nápoles, Italia
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2413	Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia

Tabla 2. Cepas de hongos filamentosos utilizadas en este trabajo

1.4. PLANTAS

La variedad de tabaco utilizada ha sido *Nicotiana tabacum* var. Xhanti.

2. MEDIOS DE CULTIVO. MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

2.1. BACTERIAS

Las cepas de *E. coli* se cultivan por lo general a 37 °C en medio LB (Luria-Bertani), suplementado con el antibiótico correspondiente en el caso de selección de bacterias portadoras de plásmido. En este trabajo, los vectores utilizados en los procesos de transformación portan el gen que confieren resistencia a ampicilina, por lo que el medio se suplementa con dicho antibiótico, quedando a una concentración final entre 50-100 mg/l.

En el proceso de obtención de células competentes a partir de la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF', la estirpe se cultiva previamente en una placa de medio LB sólido suplementado con el antibiótico tetraciclina a una concentración final de 12.5 mg/l. El procedimiento completo para la preparación de estas células se explica detalladamente en el apartado 12.1.1.1.

La estirpe de *E. coli* SOLR, utilizada en el escrutinio de la genoteca construida en el vector λ -ZAPII, se mantiene en medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 50 mg/l.

El medio del cultivo utilizado para la estirpe BL21, utilizada para la obtención de proteína de fusión GST-GLA66, se detalla en el apartado 15.2.

El medio utilizado para la cepa patógena *P. syringae*, así como su cultivo, se describen en el apartado 20.1.

Para el mantenimiento a corto plazo, las cepas son viables en medio sólido a 4°C durante aproximadamente un mes. Para almacenarlas a largo plazo, se cultivan en medio líquido hasta saturación. A partir del cultivo se prepara una suspensión en glicerol al 20% (v/v), que se congela en N₂ líquido y se almacena a -80 °C.

Medio LB: 10g/l de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10g/l de NaCl. Para la obtención de medio sólido se añade agar a una concentración de 15g/l.

Antibióticos: Como norma general se prepara una solución concentrada del antibiótico que se esteriliza por filtración y se almacena a -20°C. En el caso de la **ampicilina** y de la **kanamicina**, se prepara a 100 mg/ml en agua destilada. La **tetraciclina** se disuelve en etanol a una concentración final de 50 mg/ml.

2.2. LEVADURAS

La cepa JDS+S es portadora de una mutación termosensible que afecta a la enzima RNA polimerasa II, por lo que los cultivos tanto en medio líquido como en sólido se llevan a cabo a 26 °C. La estirpe silvestre se cultiva en **medio rico YPD**. Cuando se lleva a cabo un proceso de transformación, las células portadoras de plásmido se seleccionan y mantienen posteriormente en **medio mínimo YNB**, carente del requerimiento concreto, cuya síntesis aporta el vector con el que se transforma. En nuestro caso, es el uracilo.

Medio rico YPD: 10g/l de extracto de levadura, 20 g/l de bacto-peptona, 20g/l de glucosa. La glucosa se esteriliza por filtración y se añade tras el proceso de autoclavado, evitando así el oscurecimiento del medio que ocurre por la caramelización de ésta. Para medio sólido se añaden 15g/l de agar.

Medio mínimo YNB: 20 g/l de glucosa, 5 g/l de sulfato amónico, 1.7 g/l de bases nitrogenadas sin aminoácidos ni sulfato amónico o YNB (Difco). Tras disolver los componentes se ajusta el pH a 6.0 para medio líquido o pH 6.5 para sólido con KOH 1N. Los aminoácidos necesarios para solventar las auxotrofias de la cepa silvestre se pueden añadir antes o después de autoclavar el medio. En nuestro caso son:

-**Triptófano:** Se añade hasta una concentración final de 100 mg/l. Se prepara una solución concentrada 50 veces en agua destilada y se esteriliza por filtración, protegiéndola posteriormente de la luz.

-**Histidina:** Se añade hasta una concentración final de 100 mg/l. Se prepara una solución concentrada 50 veces en agua destilada y se esteriliza por filtración.

-**Leucina:** Se añade al medio hasta una concentración final de 250 mg/l. De igual manera, se prepara una solución 50 veces concentrada en agua destilada, se disuelve con ayuda de calor y se esteriliza por filtración.

De forma opcional se pueden añadir al medio **metionina** y **lisina** a concentraciones finales de 20mg/l y 30 mg/l respectivamente. Los aminoácidos preparados se almacenan a temperatura ambiente (TA) o bien a 4 °C. Al igual que ocurre con el YPD, es conveniente añadir la glucosa después del proceso de autoclavado. Para el medio sólido se añaden 15 g/l de agar (Difco).

Para el mantenimiento a corto plazo, las levaduras mantienen la viabilidad en medio sólido durante 2-3 semanas a 4 °C. Para un almacenamiento a largo plazo, se parte de un cultivo líquido saturado para preparar una suspensión de células con glicerol al 15% (v/v). Se congela posteriormente con N₂ líquido y se almacena a -80 °C.

2.3. HONGOS FILAMENTOSOS

2.3.1. Cultivo para mantenimiento y esporulación

Los hongos se mantienen en **medio rico PDB y PDA** (PDB con agar). En el caso de *R. solani*, que no esporula, el cultivo en PDA se usa para obtener propágulos. De igual forma se utiliza el **medio rico PPG**, donde el crecimiento de los micelios se halla favorecido. Si se requiere la formación de colonias, se añade al medio tritón X-100 a una concentración final del 0.1% (v/v).

En el caso de *T. harzianum* CECT 2413, el período necesario para la esporulación es de una semana aproximadamente, creciendo entre 25-28 °C; y el rendimiento por caja de Petri suele ser de 10⁸ esporas por mililitro.

Las esporas se recogen en condiciones de esterilidad añadiendo a cada caja 10 ml de agua destilada a la superficie del micelio, rascando suavemente con un asa para desprenderlas de éste. En el caso de *B. cinerea*, cuyas esporas son muy hidrófobas, se añade 0.1% de Tritón X-100 en agua.

Para eliminar los restos de micelio, la suspensión se pasa por un cono de papel de filtro estéril y se lava con agua dos veces, centrifugando a 1500 g durante 5 min. Finalmente las esporas se resuspenden en 5-10 ml de agua y se cuentan al microscopio con ayuda de una cámara de Burker.

Tanto las suspensiones como el micelio crecido en caja, pueden almacenarse a 4°C durante 5 ó 6 semanas. El mantenimiento a largo plazo se puede realizar guardando o bien una suspensión de esporas, o bien discos de micelio obtenidos a partir de medio sólido, en glicerol al 20% (v/v) a -80 °C.

Medio rico PDB: 24 g/l del preparado comercial "Potato Dextrose Broth" (PDB, Difco, España). Para la obtener medio **PDA** se añaden 15g/l de agar a un medio PDB.

Medio rico PPG: 20 g/l de puré de patatas (Maggi, España), 20 g/l de glucosa y 20 g/l de agar.

Tritón X-100: La solución concentrada de reserva se prepara al 20 % (v/v).

2.3.2. Cultivo para la realización de experimentos de inducción y regulación génica

Como norma general se realizan los cultivos en **medio mínimo o MM**, aunque excepcionalmente se ha utilizado **medio salino o SM**. Para los experimentos de inducción y regulación llevados a cabo con *Trichoderma* en medio líquido, se obtiene previamente biomasa realizando un precultivo en medio mínimo con 20 g/l de glucosa. Para ello se inoculan las esporas a una concentración final de 10⁶/ml de cultivo y se mantiene en agitación (~300 rpm) a 28 °C durante 30 h. Posteriormente se filtra el micelio por papel de filtro con ayuda de un kitasato, conectado a una bomba de vacío. Este procedimiento se lleva a cabo en condiciones de esterilidad. La pastilla de micelio retenida en el papel se lava con 1 volumen de MgCl₂ 0.1 M, para eliminar los restos de glucosa, y con dos volúmenes de agua destilada estéril. El micelio se reinocula entonces en medio mínimo suplementado con la fuente de carbono o con la condición concreta de estrés que se quiera estudiar, y se mantiene durante el tiempo de inducción requerido. Finalmente, el cultivo se filtra de nuevo para separar el sobrenadante y retener el micelio, el cual puede almacenarse a -80 °C, hasta su posterior análisis.

En este trabajo también se realizan estudios sobre la regulación génica a partir de cultivos realizados en medio sólido. En este caso el micelio se crece sobre un **disco de**

celofán dispuesto sobre el medio, el cual hace posible el paso de los nutrientes y permite recoger la muestra de forma limpia y sencilla para su posterior análisis. Para la realización de esta técnica, se dispone sobre el celofán una suspensión de esporas o bien un disco de micelio, prescindiendo en ambos casos del precultivo. La caja debidamente sellada se incuba a 28 °C, para permitir un correcto desarrollo del microorganismo.

Medio mínimo MM: 15 g/l de KH_2PO_4 y 1ml/l de solución de metales traza (5 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6 g/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.4 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 3.7 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). El pH se ajusta a 5.5 con KOH 1N. Una vez autoclavado, se deja enfriar el medio hasta 50-55 °C y se añaden 0.6 g/l de MgSO_4 , 0.6 g/l de CaCl_2 y 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El CaCl_2 se esteriliza por filtración.

Como fuentes de carbono se utilizan 20 g/l, 2 g/l y 1 g/l de glucosa, 20 ml/l ó 1 ml/l de glicerol; 20 g/l de maltosa; 20 g/l de lactosa; 20 g/l de xilosa; 20 g/l de rafinosa; 10 g/l de N-acetil- β -D-glucosamina; 5 g/l de polvo de quitina obtenido a partir de escamas ó 2 g/l de paredes celulares de *B. cinerea*.

Para los experimentos con medio tamponado se usa 0.2 M de MES y se fija el pH a 6.0 con KOH 10 N.

Medio salino SM: 2.8 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.6 g/l de urea, 4 g/l de KH_2PO_4 , 0.6 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l de MgSO_4 , 0.01 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0028 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0032 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Como fuente de carbono se añade 20 g/l, 2 g/l ó 1 g/l de glucosa; 20 ml/l ó 1 ml/l de glicerol, 5 g/l de polvo de quitina ó 10 g/l de N-acetil- β -D-glucosamina.

Discos de celofán: Para su preparación, se recortan círculos a partir de los pliegos de celofán con un diámetro aproximado al de la caja de Petri. Se sumergen los discos en un vaso de precipitado con agua destilada y se hierven 10 min en el microondas. Se colocan los discos individualmente entre papeles de filtro previamente humedecidos con agua destilada. Se empaquetan y se autoclavan para su esterilización.

2.3.2.1 Ensayos de confrontación

En los estudios de regulación génica, se realizan ensayos de confrontación para determinar los factores que afectan a la región promotora del gen *chit33* de *T. harzianum*. Para ello discos de micelio de *Trichoderma* se confrontan con discos procedentes de *B. cinerea* CECT 2100, *R. solani* CECT 2815 y *R. solani* 1450. Se colocan uno frente al otro sobre el celofán que cubre el medio sólido. Las cajas debidamente selladas se incuban a 28 °C hasta su posterior análisis.

2.4. PLANTAS

2.4.1. Esterilización de semillas

Las semillas se esterilizan incubándolas durante 20 min en una solución de hipoclorito sódico al 7-8 %. A continuación se lavan dos veces durante 20 min con agua desionizada estéril y agitación parcial. Se almacenan en agua a 25 °C.

2.4.2 Cultivo *in vitro*

La manipulación del material vegetal se realiza en esterilidad, en una cámara de flujo horizontal, con medios autoclavados y utensilios como pinzas y bisturís esterilizados por calor.

El cultivo *in vitro* se utiliza para la propagación vegetativa de plantas de tabaco, y la realización de estudios de segregación a partir de las F_n de las plantas transformadas en medio selectivo.

El medio de cultivo utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962), que se esteriliza mediante autoclave y se dispensa en cajas Petri o en contenedores Magenta (Sigma, Madrid, España). Para la selección de plantas transgénicas, el medio se complementa con kanamicina hasta una concentración final de 300 mg/l (**MS+Kan300**) cuando la temperatura desciende a 55-60 °C. Para proceder a la siembra, las semillas permanecen previamente durante 24 h en oscuridad embebidas en agua. Para extenderlas de forma homogénea en las placas de medio de cultivo se utiliza agarosa de cobertera previamente fundida y atemperada, para evitar así que un exceso en la temperatura dañe de forma irreversible la viabilidad de las semillas. En primer lugar, las semillas se reparten en tubos de 5 ml a los que se añaden 3 ml de agarosa de cobertera, adicionando el antibiótico si fuera necesario; se mezcla por inversión y se vierte el contenido sobre la caja con el medio de cultivo. Posterior a la siembra, se mantienen las cajas debidamente selladas en oscuridad a 25 °C durante un par de días para promover la germinación.

La concentración de kanamicina una vez seleccionadas las plantas transgénicas en caja, puede bajar hasta 100 mg/l en posteriores pasos de propagación en contenedores Magenta. De este modo se promueve un crecimiento más rápido de la planta.

Una vez que el tabaco germinado alcanza una altura de 4-5 cm, si se precisa, se pasa a maceta donde se siembra en una mezcla homogénea de tierra y “perlita” (virutas de poliuretano) en proporción 3:1, previamente esterilizada mediante autoclave. Para evitar una desecación rápida del material vegetal tras sacar la muestra del contenedor Magenta, donde la humedad relativa (Hr) es alta, las plantas se cubren con una bolsa transparente que permiten el paso de la luz a la vez que mantienen una correcta humedad del ambiente. La progresiva adaptación al medio se realiza generando orificios paulatinamente en la bolsa a lo largo de los días, hasta que finalmente ésta se retira.

El crecimiento de las germímulas y de las plantas se lleva a cabo en una cámara de plantas con los siguientes parámetros controlados: temperatura constante de 25 °C, Hr del 80% y régimen de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Medio MS: 4.3 g/l de mezcla basal de MS (Murashige & Skoog, Sigma), 0.1 g/l de mio-inositol, 1 ml/l de vitaminas 1000x, 30 g/l de sacarosa. El pH se ajusta a 5.7 con 1 M de NaOH. Para medios sólidos, se añaden 6 g/l de agar (Difco).

Vitaminas 1000x: 0.05 g/l de nicotina, 0.005 g/l de tiamina, 0.005 g/l de piridoxina, 0.005 g/l de ácido fólico, 0.0005 g/l de biotina, 0.025 g/l de glicina.

MS germinación: MS sólido. Para seleccionar las semillas de las plantas transgénicas, se añaden 300 mg/l de kanamicina.

Agarosa de cobertera: 0.6% de agar en agua. Se esteriliza mediante autoclave.

2.4.3. Tratamiento de las plantas con ácido salicílico

Las hojas de tabaco se cortan al nivel del pecíolo y éste se introduce en una solución de ácido salicílico (SA) 1 mM, previamente preparada en 100 mM de tampón fosfato a pH 6.0 y 0.025% de Tritón X-100 (v/v).

El SA es poco soluble en agua, por lo que se prepara una solución concentrada (200 mM) en metanol al 55%. A partir del volumen stock, se preparan las soluciones necesarias diluyendo con tampón fosfato. Por lo tanto, los correspondientes controles se trataron con una solución de metanol al 0.275% (v/v) y de Triton X-100 al 0.025% (v/v) en tampón fosfato 100 mM pH 6.0.

3. MANIPULACIÓN DE DNA

3.1. VECTORES UTILIZADOS

3.1.1. Vectores procedentes del bacteriófago λ

En este trabajo se utilizan dos genotecas diferentes. Una de ellas es una genoteca de DNA genómico (gDNA) de *T. harzianum* CECT 2413 (Lora *et al.*, 1995) construida en el vector LambdaGEM[®]-11 (Promega, USA). *Xba*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Xho*I o *Sac*I son algunas de las dianas de los sitios de clonación múltiple adyacentes a los brazos del fago, los cuales pueden albergar fragmentos de gDNA de hasta 14 kilobases. La otra es una genoteca de cDNA construida en el vector Lambda Uni-Zap XR (Stratagene). El proceso de obtención se describe en el apartado 22.

3.1.2. Vectores plasmídicos y construcciones realizadas

pBluescript[®] II SK (+) (Stratagene): El vector pSK+ se utiliza para los pasos de clonación previos a las construcciones definitivas. Asimismo sirve como herramienta para los procesos secuenciación de los clones obtenidos es este trabajo.

pGEM-T[®] (Promega): Este vector se utiliza para la clonación y secuenciación de fragmentos de DNA procedentes de amplificaciones por PCR, realizadas con aquellas polimerasas que dejan residuos terminales de adeninas en los extremos del fragmento amplificado.

pCR[®]4-TOPO (Invitrogen): Este vector se utiliza para clonar y secuenciar los fragmentos obtenidos por PCR, en el proceso de determinación de los orígenes de transcripción de los dos mensajeros sintetizados a partir de *gla66*. En el apartado 3.8.1, se describe más detalladamente este plásmido y su mecanismo de acción.

pGEX-4T-2 (Amersham Biosciences): Este plásmido se ha utilizado para la expresión heteróloga de de proteínas en bacterias. Contiene bajo el control del promotor *ptac*, inducible por IPTG, la secuencia del gen que codifica para la glutatión-S-transferasa (GST). A continuación de ésta se localiza un lugar de reconocimiento para la proteasa trombina y en un sitio de clonación múltiple.

pZEGA1 (Zeilinger *et al.*, 1999): Vector originado a partir del plásmido pUC19, que porta el gen sintético SGFP-TYG (Sheen *et al.*, 1995) bajo el promotor constitutivo de la piruvato kinasa (*ppki*) de *T. reesei*. Este marcador génico deriva del gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aquorea victoria*, que porta una mutación puntual (S₆₅→T). La proteína codificada se excita más rápidamente con luz azul y emite fluorescencia de forma más intensa.

pRLMex60 (Mach *et al.*, 1999): Este plásmido procede del vector pUC19 y contiene el gen que codifica la glucosa oxidasa (*goxA*) de *A. nidulans* bajo el promotor constitutivo de la piruvato kinasa de *T. reesei*.

pLMRS3 (Mach *et al.*, 1994): Se utiliza como vector de expresión en los experimentos de transformación de *Trichoderma*. En este plásmido, los genes de interés están bajo el promotor de la piruvato kinasa (*pki*) y el terminador de la celobiohidrolasaII, ambos de *Trichoderma reesei*.

p3SR2 (Kelly & Hynes, 1988): Este vector se utiliza en los procesos de cotransformación de *Trichoderma*. Porta el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que codifica una acetamidasa, lo que permite utilizar la acetamida como fuente de nitrógeno y como marcador de selección.

puY1 (Vilela *et al.*, 1998): Vector centromérico utilizado en los experimentos de expresión heteróloga en levaduras. En este plásmido, la región 5' no codificante del gen *YAP1* de *S. cerevisiae* está clonada entre el promotor constitutivo *pTEF1* y el gen de la luciferasa (*LUC*). Este vector, que deriva del plásmido YCp22FL (Vega Laso *et al.*, 1993), porta la información necesaria para la síntesis de uracilo (*URA3*).

pSK-CHIT33 (EN) [Limón, 1999, Tesis Doctoral]: Lleva el cDNA de *chit33* procedente del fago $\Phi 5$ (cDNA completo) cortado con *EcoRI* y *NotI* y clonado en el vector pSK cortado con *EcoRI/NotI*.

pCHIT42S (García, 1997, Tesis Doctoral): Lleva el cDNA de *chit42* cortado con *EcoRI* y *NotI*, tratado con la polimerasa Klenow y clonado en el vector pSK cortado con *SmaI*.

pSK-GLA66: Clon que contiene la secuencia del cDNA de la glucoamilasa de 66 kD de *T. harzianum* que incluye una pequeña parte de la región 5' no codificante. Deriva de la escisión del fago $\Phi 3.7$ procedente de la genoteca de cDNA construida en λ -ZAP[®]II.

pSK-gXhoI: Clon que porta DNA genómico de *T. harzianum*, procedente del fago $\Phi 1$, que comprende el promotor y parte de la secuencia 5' codificante del gen *gla66*.

pGEX-GLA66: Vector que porta la fusión traduccional GST-GLA66. La construcción se realiza subclonando el fragmento liberado con *EcoRI/XhoI* a partir de pSK-GLA66 en el vector pGEX-4T-2, digerido con las mismas enzimas de restricción. Incluye por tanto residuos adicionales en la región amino terminal de GLA66, procedente de la región líder del cDNA.

pZEGA33 (Dana *et al.*, 2001): Construcción derivada del vector pZEGA1 en la que el promotor de la piruvato kinasa (*ppki*), clonado en *XhoI/XbaI*, se reemplaa por el promotor de la quitinasa de 33 kDa de *T. harzianum* (*pchit33*); controlando de este modo por tanto, la expresión de la proteína GFP.

pMDJ1 (Dana *et al.*, 2001): Construcción originada a partir del vector pRLMex60 al sustituir el promotor *ppki*, clonado en *XhoI/XbaI*, por el promotor *pchit33* de *T. harzianum*.

pLMRS3-GLA66: Construcción realizada a partir de la amplificación del cDNA del clon pSK-GLA66, utilizando los cebadores específicos de secuencia AMY5'XbaI y AMY3'NsiI. La región amplificada comprendía la ORF completa del gen *gla66*, obviando la región 3' no codificante.

pGRacer5'-R1662: Construcción que contiene el producto de PCR sintetizado a partir de los cebadores GeneRacer™ 5' Primer y R1662 subclonado en el vector pCR®4-TOPO. La reacción de PCR se realiza sobre el producto derivado de la retrotranscripción del mensajero de 2.67 kb procedente de *gla66*. El cebador R1662 es específico de la secuencia de la glucoamilasa. Este proceso de RT-PCR se detalla en el apartado 23 referido al RACE.

pGRacer5'-R481: Construcción realizada en el vector pCR®4-TOPO que alberga el producto amplificado por PCR, a partir del mismo molde de cDNA utilizado en el caso anterior, usando en esta ocasión de los cebadores GeneRacer™ 5' Primer y R481. Este último es también específico de la secuencia de *gla66*.

pR478-GRacer3': Construcción en la que se usa el vector pCR®4-TOPO para subclonar el producto obtenido por PCR a partir del mismo molde de cDNA que en los dos casos anteriores, utilizando los cebadores específicos R478 y GeneRacer™ 3' Primer.

pwUTR: Construcción que deriva del plásmido puY1, donde la región 5' líder del gen *YAP1* se sustituye por la del RNA mensajero de 2.67 kb que se transcribe a partir del gen *gla66*. La región 5' no codificante o 5'-UTR de este mensajero, contiene dos ORFs (uORFs) aguas arriba de la principal, la cual codifica la proteína GLA66. La uORF1 generaría un péptido putativo de 23 aminoácidos. La uORF2 está en fase con la de GLA66 y teóricamente codificaría una proteína putativa con un peso molecular aproximado de 70 kDa. Las construcciones derivadas a partir de ésta, realizadas mediante mutagénesis dirigida, se detallan en el apartado 5.3.2 de *Resultados III*.

3.2 RESTRICCIÓN DEL DNA

La digestión del DNA mediante enzimas de restricción, suministradas fundamentalmente por las casas comerciales Amersham Biosciences y Roche, se realiza según las condiciones recomendadas por el fabricante. Generalmente se considera que una unidad de enzima es capaz de digerir 1µg de DNA. El volumen de enzima añadida no debe superar 1/10 del volumen final de reacción.

Para las digestiones dobles, si no existe un tampón compatible, se utiliza el **tampón OPA** ("One-Phor-All", Amersham Biosciences) a la concentración recomendada por el fabricante. En el caso de enzimas con distintas concentraciones óptimas de sales, se digiere primero con la que requiera mayor concentración de sales, aumentando el volumen final posteriormente con agua y diluyendo la mezcla, hasta alcanzar la concentración necesaria para realizar la segunda digestión.

Tampón OPA 10x: 100 mM de Tris-acetato pH 7.5, 100 mM de acetato magnésico y 500 mM de acetato potásico.

3.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Los fragmentos de DNA obtenidos a partir de PCR u originados por digestión se separan en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml. Con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta, se visualiza la banda de interés en el gel y se recorta con ayuda de un bisturí. La porción que contiene la banda se guarda a 4 °C o se procesa para la eliminación de la agarosa de la muestra y la obtención del DNA, haciendo uso del producto GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Este método consiste en solubilizar la agarosa para facilitar la unión del DNA a una matriz y la posterior elución de éste en un volumen pequeño de agua o de TE 1x.

TE 1x: 1 mM de EDTA, 10 mM de Tris-HCl pH 8.

3.4. PRECIPITACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para precipitar el DNA se añade a la muestra 1/10 de su volumen de 3 M de acetato sódico pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Tras mezclar bien, se incuba a -20 °C durante al menos dos h, o bien a -80 °C durante 5 min. Se centrifuga posteriormente 10 min a 13000 g. Se retira el sobrenadante y se lava el precipitado con 1 ml de etanol frío al 70% (v/v). Se elimina a continuación cualquier posible resto de etanol y se resuspende el precipitado en el volumen deseado de TE o de agua desionizada estéril.

Cuando la cantidad de DNA es pequeña, se añade 1µl de glucógeno de concentración 10 mg/ml (p/v), para facilitar la precipitación y la visualización del precipitado.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.5.1. Por espectrofotometría

Para la cuantificación mediante espectrofotómetro se diluye la muestra y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Se considera que una unidad de densidad óptica (OD) equivale a una concentración de 50 µg/ml de DNA de doble cadena y de 40 µg/ml de RNA. Se utilizan cubetas de cuarzo.

3.5.2. Por tinción con bromuro de etidio en gel

Este método se utiliza para cuantificar cantidades pequeñas de DNA. El bromuro de etidio interacciona con el DNA en el gel, al ser un agente intercalante, y permite su visualización al ser irradiado con luz ultravioleta. Para cuantificar la muestra, comparamos su intensidad con la que posee un patrón de concentración conocida. En nuestro caso el patrón utilizado ha sido el DNA del bacteriófago λ digerido con *EcoRI/HindIII* o bien el patrón comercial Smart-Ladder (Eurogentec).

3.6. GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS

3.6.1. Relleno de extremos 5' prominentes

La polimerasa Klenow rellena extremos 5' prominentes gracias a su actividad DNA polimerasa 5'→3'. Tras la digestión con la enzima de restricción adecuada, se purifica el fragmento digerido por gel. Para la reacción se añade el DNA, el tampón de la polimerasa a concentración final 1x, 1 µl de 0.5 M de dNTPs y 2 U de Klenow (Amersham Biosciences), para un volumen final de 30 µl. Posteriormente se incuba la mezcla a 30 °C durante 15 min. La enzima se inactiva calentando a 75 °C durante 10 min. La muestra se almacena a -20°C hasta su uso.

3.6.2. Degradación de extremos 3' prominentes

Cuando la enzima de restricción utilizada genera extremos 3' prominentes, éstos se eliminan por la actividad exonucleasa 3'→5' de la enzima T4 DNA polimerasa. Para llevar a cabo la reacción se añade el volumen necesario del tampón de la enzima para que quede a una concentración final de 1x, 6 µl de 0.5 mM de dNTPs y 1 U de T4 DNA polimerasa (Roche) por cada 20 µl de reacción. La mezcla se incuba posteriormente a 30 °C durante 15 min. Se almacena a -20°C hasta su uso.

3.7. DESFOSFORILACIÓN DE PLÁSMIDOS

Los plásmidos linearizados, tras digerirlos con una enzima de restricción, pueden autoligarse en ligaciones posteriores. Para evitarlo, es conveniente desfosforilarlos previamente. Para ello, el vector purificado por gel, se incuba con 1 U de fosfatasa CIP (Calf Intestine Phosphatase, Roche) en 40 µl de tampón 1x de fosfatasa alcalina durante 30 min a 37 °C. La enzima se inactiva calentando 10 min a 75 °C. La mezcla de reacción se guarda a -20°C hasta su uso.

3.8. LIGACIONES

Las reacciones de ligación se realizan en volúmenes pequeños, normalmente entre 10-15 µl. La proporción entre el vector y el inserto es aproximadamente 1:3, respectivamente. Una mezcla de reacción estándar contiene: 50 ng de plásmido digerido y desfosforilado en el caso de tener extremos compatibles (ver apartado 3.7), 150 ng de inserto, tampón de ligasa de DNA hasta concentración final 1x y 1 U de enzima T4 DNA ligasa (Roche). En el caso de extremos cohesivos, se incuba la reacción 1-2 h a TA. Para obtener una mayor eficiencia, la ligación se incuba durante 8 h a 14 °C. Cuando las moléculas de DNA contienen extremos romos, se utilizan estas últimas condiciones, ya que estas ligaciones son menos eficientes que las realizadas entre extremos cohesivos. La mezcla de reacción se guarda a -20 °C hasta su uso.

3.8.1. Ligaciones en el vector pCR[®]4-TOPO

El vector pCR[®]4-TOPO (Invitrogene) contiene en cada uno de sus extremos libres la topoisomerasa I del virus *Vaccinia*, unida covalentemente por su residuo Tyr-274 a la timidina colgante del extremo del vector. El enlace fosfo-tirosil, existente entre

la enzima y el vector, reacciona con el extremo 5' hidroxilo del inserto amplificado que va a clonarse. La energía que se genera al romper este enlace, se aplica en la formación de otro nuevo enlace entre el inserto y el plásmido, liberándose la topoisomerasa del complejo. Este vector contiene las secuencias de M13 directa e inversa (M13_F y M13_R, respectivamente), lo que lo convierte en una herramienta útil para procesos de secuenciación. La Figura 1 muestra un esquema sobre el proceso de ligación en este plásmido:

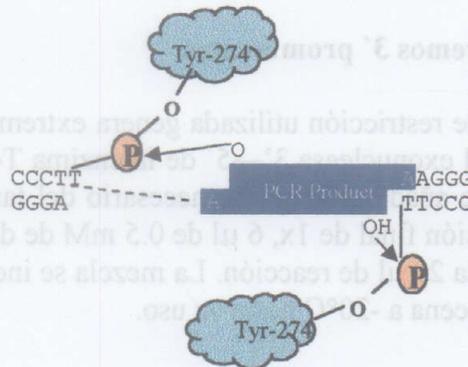


Figura 1. Proceso de ligación en el vector pCR®4-TOPO

Para llevar a cabo la ligación en este vector se mezclan 0.5-4 μl de DNA amplificado, 1 μl de **solución salina** (no añadir en el caso de transformar por electroporación, ver apartado 13.1.2), agua desionizada estéril hasta 5 μl y 1 μl de vector pCR®4-TOPO (10 ng/ μl). La mezcla de reacción se incuba 5 min a TA y se guarda a -20 °C hasta su uso.

Solución salina: 1.2 M de NaCl y 0.06 M de MgCl₂.

4. EXTRACCIÓN DE DNA

4.1. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE *E. coli*

Los plásmidos contenidos en *E. coli* se obtienen según el protocolo de **lisis alcalina** descrito por Sambrook *et al* (1989). Este procedimiento se realiza a pequeña escala o “miniprep”, a media escala o “midiprep” o bien a gran escala o “maxiprep”; siendo el volumen de cultivo de partida de 3 ml, 25ml ó 200 ml respectivamente. A continuación se esquematiza el proceso de obtención a pequeña escala:

1. Se inocula una colonia de *E. coli* en 3-4 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Se incuba al menos 8 h a 37 °C.
2. Se centrifuga el cultivo 13000 g durante 1 min. Se retira el sobrenadante.

3. Se resuspenden las células en 100 μ l de **Solución I**.
4. Se añaden 200 μ l de **Solución II**, preparada en el momento. Se mezcla por inversión y se incuba 5 min a TA.
5. Se añaden 300 μ l de **Solución III** a 4 °C. Se mezcla de nuevo por inversión y se incuban en hielo durante 5 min.
6. Se centrifuga a 13000 g durante 15 min y se recoge el sobrenadante. Se repite este paso para eliminar posibles restos celulares.
7. Es **opcional** la extracción con un volumen de F:C:I. Para ello se agita vigorosamente, tras añadirlo a la muestra, y se centrifuga 5 min a 13000 g. Se recoge la fase acuosa. Se añade un volumen de cloroformo, se agita vigorosamente y se centrifuga a 13000 g durante 5 min. Se recoge la fase acuosa.
8. Se añaden 2 volúmenes de alcohol isopropílico y se incuba la mezcla 10 min a TA.
9. Se centrifuga 10 min a 13000 g y se elimina el sobrenadante.
10. El precipitado se lava con 1 ml de etanol frío al 70%.
11. Se centrifuga 5 min a 13000 g y se retira el sobrenadante.
12. Una vez seco el precipitado, se resuspende en 50 μ l de TE con **RNAsa A** (a concentración final de 25 μ g/ml). Se incuba a 37 °C al menos 1 h.

Solución I: 25 mM de sacarosa, 10 mM de EDTA y 25 mM de tampón Tris-HCl pH 8.

Solución II: 0.2 N de NaOH y 1% de SDS.

Solución III: 3 M de acetato potásico pH 5.3.

F:C:I : Mezcla realizada con fenol equilibrado, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, respectivamente. El fenol se equilibra a pH 8.0 con Tris.

RNAsa A: Se prepara una solución concentrada disolviendo 10 mg/ml de la enzima en 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 con 15 mM NaCl. La mezcla se incuba a 90 °C durante 15 min y se deja enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. Posteriormente se almacena a -20 °C.

Para la obtención de plásmido a media y gran escala, se preparan volúmenes de cultivo proporcionales a los anteriores. Tras el paso 6, la muestra se pasa a través de un cono de papel de filtro estéril, y se continúa de igual forma el protocolo.

4.2. OBTENCIÓN DE DNA DE FAGOS

En este trabajo, los fagos se obtienen a partir de halos de lisis en medio sólido, aunque el material de partida puede obtenerse del mismo modo a partir de un lisado en cultivo líquido. Las calvas de lisis se consiguen como se describe en el apartado 11.1.2 y se incuban hasta que confluyan los halos. Posteriormente se procede como se describe a continuación:

1. Para recoger los fagos, se lavan las cajas durante al menos 8 h a 4 °C con 5 ml de **tampón SM** por caja de Petri de 10 cm de diámetro.
2. Se recoge la suspensión de fagos en SM y se añaden 100 μ l de cloroformo para destruir las bacterias intactas.
3. La suspensión de fagos se traspasa a un vaso de precipitado de vidrio y se añaden 5.8 g de NaCl por cada 100 ml de suspensión. Una vez disuelto, se incuba a 4 °C durante 1 h.
4. Se centrifuga a 8000 g durante 10 min a 4 °C.

5. Se recoge el sobrenadante y se añaden 10 g de PEG 8000 por cada 100 ml de suspensión. Una vez disueltos, se incuba la suspensión con agitación a 4 °C durante 1 h.
6. Se centrifuga a 8000 g durante 10 min. Se elimina el sobrenadante
7. El precipitado seco se resuspende en 1 ml de tampón SM.
8. Se añade un volumen de cloroformo y se agita vigorosamente. Se centrifuga 5 min a 13000 g.
9. A la fase acuosa se le añade EDTA pH 8.0 hasta una concentración final de 20 mM, SDS hasta el 0.5% y **proteinasas K** hasta 50 µg/ml. Se incuba 1 h a 56 °C.
10. Se añade un volumen de fenol equilibrado. Se agita vigorosamente y se centrifuga a 13000 g durante 5 min a TA.
11. Se añade 1 volumen de fenol equilibrado:cloroformo (1:1). Se agita vigorosamente y se centrifuga a 13000 g durante 5 min a TA.
12. A la fase acuosa, se le añade un volumen de cloroformo, se agita y se centrifuga de nuevo 5 min a TA y a 13000 g.
13. Se recoge la fase acuosa y se le añade un volumen de isopropanol. Se mezcla por inversión y se centrifuga inmediatamente 10 min a 13000 g. Se lava con un volumen de etanol frío al 70%.
14. Una vez seco, el precipitado se resuspende en 30 µl de agua desionizada. Para evitar roturas en el DNA, éste se resuspende mediante movimientos suaves (se aconseja el uso de puntas de pipetas cortadas) o bien se deja a 4 °C toda la noche.
15. Se chequean 2 µl de la muestra en un gel de agarosa al 0.8%.

Tampón SM: 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 100 mM de NaCl, 10 mM de MgSO₄ y 0.02% de gelatina (p/v).

Proteinasas K: Se prepara una solución concentrada de la enzima a 10 mg/ml.

4.3. OBTENCIÓN DE gDNA DE *T.harzianum*

La biomasa que se procesa se obtiene a partir de un cultivo líquido en PDB recogiendo el micelio por filtración. Por otra parte, también puede obtenerse a partir de esporas germinadas sobre un disco de celofán en medio rico. En este último caso, tras incubar la caja debidamente sellada durante 3-4 días a 28 °C, el micelio se recoge con una espátula. En cualquier caso, la muestra se congela a -80 °C hasta su procesamiento. Los pasos para la obtención de gDNA se detallan a continuación:

1. La muestra se pulveriza en un mortero con ayuda de N₂ líquido.
2. Se recogen aproximadamente 100 mg de muestra en un tubo de 2 ml.
3. Se añaden 600 µl de tampón de lisis **CTAB 2x** y se agita vigorosamente.
4. La mezcla se incuba a 65 °C durante 30 min.
5. Se añaden 600 µl de cloroformo, se agita y se centrifuga 15 min a 13000 g.
6. La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo y se le añaden 600 µl de isopropanol. Se precipita el gDNA a -20 °C durante al menos 1 h.
7. Se centrifuga a 13000 g durante 15 min a 4 °C.
8. El precipitado se lava con 1 ml de etanol frío al 70 % y se centrifuga 5 min a 13000 g.
9. Una vez seco, el precipitado se resuspende en 150 µl de tampón TE, a los que se les añaden 15 µl de solución concentrada de RNasa A (10 mg/ml).

10. La solución se incuba a 37 °C durante al menos 1 h.
11. La muestra se analiza en un gel de agarosa al 0.8%. La solución de DNA se guarda bien a 4°C o a -20 °C hasta su uso.

Tampón de lisis CTAB 2x: 100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M de NaCl, 20 mM de EDTA pH 8.0, CTAB al 2% (p/v) y β -mercaptoetanol al 0.2% (p/v). La mezcla de los componentes del tampón se incuba a 75 °C durante 30 min. Posteriormente se deja enfriar hasta temperatura ambiente, y se le añade el mercaptoetanol. El CTAB (cetil trietil amonio bromuro) es un detergente en el que, en presencia de altas concentraciones de sal, los ácidos nucleicos forman complejos solubles y estables. Se elimina fácilmente dada su solubilidad en etanol.

5. EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de RNA, se realizan protocolos específicos según cuál sea el organismo de partida. No obstante, como norma general en todos los casos, el material y el agua se tratan con dietil-pirocarbonato (DEPC); que inactiva las RNAsas. El DEPC se disuelve en agua (1ml/l) y se deja actuar durante al menos 8 h. Posteriormente, para eliminarlo, se autoclavan el material y el agua.

5.1 EXTRACCIÓN DE RNA DE LEVADURAS

En nuestro caso, hemos utilizado la cepa de *S. cerevisiae* JDS+S, que contiene una versión termosensible de la RNA polimerasa II, por lo que la temperatura de crecimiento para los cultivos es de 26 °C. Para la obtención de RNA, se sigue el protocolo detallado a continuación:

1. Se inocula una colonia en 5 ml de medio y se incuba con agitación (250 rpm) como mínimo 8 h, hasta que alcance una OD entre 0.4 - 0.8.
2. Se centrifuga el cultivo a 1800 g durante 5 min. El sedimento de células se lava con 1 ml de agua destilada estéril a 4 °C.
3. Se centrifuga de nuevo el cultivo. Las levaduras se resuspenden en 400 μ l de **tampón TES**. Se añaden 400 μ l de **fenol ácido** y se agita vigorosamente.
4. Se incuba a 65 °C entre 30 - 60 min, agitando ocasionalmente.
5. Posteriormente, la muestra se incuba a 4°C durante 5 min.
6. Se centrifuga a 13000 g durante 5 min a 4 °C.
7. Se recoge la fase acuosa, se le añade de nuevo 400 μ l de fenol ácido y se agita enérgicamente.
8. Se centrifuga a 13000 g durante 5 min a 4 °C.
9. Se recoge la fase acuosa, se le añade un volumen de cloroformo y se agita fuertemente.
10. Se centrifuga a 13000 g durante 5 min a 4 °C.
11. Se añade a la fase acuosa 1/10 del volumen de 3 M de acetato sódico pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto.
12. Se incuba a -20 °C durante al menos 2 h para que precipite el RNA.
13. Se centrifuga a 13000 g durante 15 min a 4 °C y se elimina el sobrenadante.

14. El precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70% (tratado con DEPC). Se centrifuga de nuevo y se elimina el sobrenadante.
15. Una vez seco el precipitado, se resuspende en 50 μ l de agua desionizada-DEPC. Para facilitar este proceso, así como para eliminar estructuras secundarias, se incuba la muestra a 50-55 °C entre 5-15 min. Las muestras se guardan a -80 °C.

Tampón TES: 0.5% de SDS, 10 mM de EDTA y 10 mM de Tris-HCl pH 7.5.

Fenol ácido: El fenol sólido se hidrata hasta saturación. La preparación se disuelve y se calienta a 55 °C.

5.2. EXTRACCIÓN DE RNA DE *T. harzianum*

Para la obtención de RNA a partir de micelio se utiliza la solución de extracción comercial Trizol Reagent (Gibco). El material utilizado se pulveriza con ayuda de N₂ líquido. El protocolo recomendado por la casa comercial se detalla a continuación:

1. Se añade 1 ml de Trizol Reagent por cada 50-100 mg de biomasa.
2. Se agita vigorosamente la mezcla unos 15 s, hasta su homogenización.
3. Se incuba a TA durante 5 min.
4. Se añaden 200 μ l de cloroformo por cada ml de Trizol y se agita de nuevo enérgicamente.
5. Se centrifuga a 13000 g durante 15 min a 4 °C.
6. Se añaden a la fase acuosa 0.5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de Trizol.
7. Se mezcla por inversión y se incuba 10 min a TA.
8. Se centrifuga a 13000 g durante 10 min a 4 °C.
9. El precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70% (en agua con DEPC).
10. Se centrifuga a 7500 g durante 5 min a 4 °C.
11. Se elimina el etanol y se deja secar el precipitado.
12. El RNA se resuspende en 50-100 μ l de agua desionizada-DEPC. Para facilitar este proceso se incuba de 5 a 10 min a 55-60 °C. La muestra se guarda a -80 °C.

5.3 OBTENCIÓN DE RNA DE PLANTAS

El procedimiento es similar al descrito en el apartado 5.2, puesto que se usa la misma solución comercial de extracción (Trizol Reagent, Gibco). No obstante, el procesamiento del material vegetal incluye dos etapas adicionales.

Por una parte, una vez homogeneizada la muestra en presencia del Trizol, se centrifuga a 13000 g durante 10 min a 4 °C, para eliminar así los restos vegetales, ricos en polisacáridos y proteínas. A continuación, se recoge el sobrenadante para añadirle el cloroformo. Por otra parte, en la precipitación del RNA por cada ml de Trizol se añaden 0.25 ml de alcohol isopropílico y 0.25 ml de una solución 1.2 M de citrato de sodio y 0.8 M de NaCl. De este modo, el RNA precipita de forma efectiva, manteniéndose solubles los polisacáridos y proteoglicanos presentes en la fase acuosa.

6. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa generan un entramado a través del cual migran los ácidos nucleicos y se separan según su tamaño. El porcentaje de la agarosa, por tanto, es crítico para la resolución de los fragmentos en el gel. Porcentajes altos facilitan la separación de ácidos nucleicos de pequeño tamaño y viceversa. Los geles de agarosa se preparan en tampón TAE 1x. El DNA se visualiza con ayuda de luz ultravioleta al usar bromuro de etidio, como agente intercalante, a una concentración final de 0.2 µg/ ml. Éste se puede añadir a la agarosa una vez fundida y atemperada, o bien puede teñirse el gel posteriormente con una solución de bromuro de etidio a la misma concentración final.

En la electroforesis de gDNA, los geles se hacen al 0.8 % de agarosa (p/v). Para casos más generales la concentración típica es del 1 %; pero si el tamaño del DNA es inferior a 500 pb, el porcentaje es del 2-3 % de agarosa. Las muestras se preparan añadiendo **tampón de carga de DNA** hasta una concentración final 1x. Una vez cargadas las muestras, se someten a un campo eléctrico de aproximadamente 10 V/cm de gel.

TAE 50x: 50 mM de EDTA, 2 M de Tris-acetato pH 8.0.

Tampón de carga DNA 6x: glicerol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0.25 % (p/v).

6.2. ELECTROFORESIS DE RNA

Para chequear la calidad o la concentración de una muestra, se utiliza un gel de agarosa al 1% en TAE 1x, como se describe en el apartado 6.1. Si las muestras van a ser transferidas a un filtro, para su posterior análisis, la electroforesis se lleva a cabo en un gel desnaturalizante como se describe en el apartado 10.1.

Se añade **tampón de carga de RNA** a las muestras hasta y se someten a un voltaje de 10 V/cm de gel.

Tampón de carga RNA 10x: glicerol al 50 % (v/v), 1 mM de EDTA pH 8.0 y azul de bromofenol al 0.25% (p/v). Todas las soluciones se realizan en agua desionizada tratada con DEPC.

7. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), permite amplificar numerosas veces un molde de DNA. El proceso consiste en la síntesis de DNA a partir de cebadores que complementan con la secuencia, a través de sucesivos ciclos y con ayuda de la enzima Taq polimerasa (Roche o Amersham Biosciences). Esta enzima resiste los cambios de temperatura del proceso de desnaturalización de las cadenas en los sucesivos ciclos, al proceder de un organismo termófilo. En este trabajo, se ha utilizado el termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Para el diseño de los cebadores se ha utilizado el programa Oligo 4.0.

7.1. REACCIÓN CONVENCIONAL DE PCR

El DNA molde de la reacción puede ser un inserto, un plásmido, o DNA procedente de fagos. Para reacciones comunes, se utiliza la Taq Polimerasa convencional (Roche o Amersham Biosciences). No obstante, para generar copias con el menor número posible de errores, se utilizan enzimas especiales como la Expand™ High Fidelity y la Pwo DNA Polymerase (ambas de Roche), capaces de corregir errores durante la síntesis de DNA. Una reacción típica, en un volumen final de 20 μ l es:

Mezcla 1 (μ l/tubo)

1 μ l de DNA molde (50-100 ng)
 2 μ l de cebador A (10 μ g/ml)
 2 μ l de cebador B (10 μ g/ml)
 2 μ l de **tampón de PCR 10x** (sin $MgCl_2$)
 2.4 μ l de $MgCl_2$ 25 mM
 7.6 μ l de agua desionizada estéril

Mezcla 2 (μ l/tubo)

1 μ l de Taq polimerasa (1 U)
 2 μ l de dNTPs 2.5 mM

La reacción de PCR consta de varias etapas. Un proceso estándar es:

1 ciclo	5 min a 95 °C (desnaturalización completa)
25-30 ciclos	$\left\{ \begin{array}{l} 0.5 \text{ min a } 95 \text{ °C (desnaturalización)} \\ 1 \text{ min a } X \text{ °C (X = Tm del cebador-5 °C)} \\ 1 \text{ min a } 72 \text{ °C (polimerización del DNA)} \end{array} \right.$
1 ciclo	7 min a 72 °C (para completar polimerización)

Para llevar a cabo esta reacción, se introducen 17 μ l de la Mezcla 1 en un tubo de PCR de 0.2 ml y se efectúa el paso de desnaturalización completa del DNA. Posteriormente se para el proceso para añadir 3 μ l de Mezcla 2. Aunque también pueden incorporarse todos los componentes desde un principio, resulta más eficiente añadir la enzima y los nucleótidos tras la etapa inicial de desnaturalización.

Por último, se añade tampón de carga de DNA a las muestras y se analizan en un gel de agarosa.

Tampón de PCR 10x: 500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl pH 8.3 y gelatina al 0.1% (p/v).

dNTPs: 2.5 mM de dATP, 2.5 mM de dTTP, 2.5 mM de dCTP y 2.5 mM de dGTP.

7.2. PCR A PARTIR DE BACTERIAS

En los procesos de transformación de bacterias, la PCR a partir de colonias constituye una forma sencilla de chequear si las que han crecido en medio selectivo son portadoras de la construcción de interés. El procedimiento en este caso es básicamente el mismo. En primer lugar, se reparte el agua en los tubos de 0.2 ml. A continuación, se pica una colonia con un palillo estéril y se introduce en el agua del tubo de PCR. Después del agua, se introduce en 1 ml de LB+Amp100 (o el antibiótico que proceda según el vector usado en la transformación). Los tubos con medio de cultivo se incuban posteriormente a 37 °C; utilizándose como preinóculo para la obtención de plásmido, aquellos que deriven de las colonias positivas según la PCR.

Cuando se haya repetido este proceso con el número de colonias que se considere necesario, se añade el resto de los componentes de la Mezcla 1 y se continúa el proceso como se detalla en el apartado anterior. Por último se analizan las muestras en un gel de agarosa.

Generalmente, los cebadores son específicos de la secuencia del vector. En este trabajo los más utilizados han sido el **M13_R** (M13 inverso) y el **M13_F** (M13 directo); aunque, en determinados casos, se han utilizado cebadores específicos de la secuencia del DNA clonado. En este último caso, las condiciones son comunes a las demás reacciones excepto la T_m , que depende de la secuencia del cebador. Otro factor variable es la concentración de $MgCl_2$, que oscila entre 1.5 y 3 mM.

Cebador M13_R: 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

Cebador M13_F: 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

7.3. PCR A PARTIR DE FAGOS

En este caso, la PCR resulta una herramienta útil para buscar fagos que contengan clonado un DNA del que se conoce la secuencia, y a partir de la cual se ha diseñado un cebador u oligo específico. En este trabajo la amplificación se realiza sobre fagos aislados de la genoteca construida en λ -ZAPII, cuyo vector contiene las secuencias M13_F y M13_R. La muestra que se amplifica, parte del eluido de fagos en tampón SM obtenido a partir de los halos de lisis aislados en la primera ronda de purificación de la genoteca (ver apartado 11.1.4). En este trabajo la PCR de fagos se lleva a cabo con el cebador **M13_R** y el cebador específico **AMY5'**. El volumen final de reacción es de 50 μ l y se procede como se indica a continuación:

Mezcla 1(μ l/tubo)

- 2 μ l de eluido de fagos
- 2.5 μ l de cebador M13_R (10 μ g/ μ l)
- 2.5 μ l de cebador AMY5' (10 μ g/ μ l)
- 5 μ l de tampón de PCR 10x
- 6 μ l de $MgCl_2$ 25 mM
- 29 μ l de agua desionizada estéril.

Mezcla 2 (µl/tubo)

1 µl Taq polimerasa (1 U)
2 µl de dNTPs 2.5 mM

La reacción consta de las siguientes etapas:

1 ciclo 5 min a 94 °C

25-30 ciclos { 50 segundos a 94 °C
 1 min a 50 °C
 1 min a 72 °C

1 ciclo 7 min a 72 °C

El producto de la reacción de amplificación se analiza en un gel de agarosa al 1%.

Cebador AMY5': 5' GGAGATGCAATCACAGCA 3'

7.4. PCR CON ENZIMAS DE ALTA FIDELIDAD

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se utilizan polimerasas especiales cuando se requiere una copia fiel del molde de DNA. Estas enzimas son la Expand™ High Fidelity y la Pwo DNA Polymerase (ambas de Roche), que se caracterizan por poseer una tasa de error de 8.5×10^{-6} frente a una de 2.6×10^{-5} , correspondiente a la Taq polimerasa convencional. Una diferencia fundamental entre ambas es que la Pwo deja extremos romos en los insertos que amplifica, mientras que la Expand, al ser una mezcla enzimática de Pwo y Taq polimerasa, genera adeninas colgantes en los extremos del inserto. Las enzimas se utilizan siguiendo las especificaciones del fabricante. En la siguiente tabla se muestra un esquema sobre las características y requerimientos de ambas enzimas por separado:

	Expand™ High Fidelity	Pwo
Mezcla 1		
dNTPs	200 µM	200 µM
Cebador X	300 nM	600 nM
Cebador Y	300 nM	600 nM
DNA molde	0.1-0.75 µg	0.1-0.75µg
H ₂ O	hasta 25 µl (v _f)	hasta 25 µl (v _f)
Mezcla 2		
Tampón de PCR 10x	1x (1.5 mM de MgCl ₂)	1x (2 mM de MgCl ₂)
Polimerasa	0.75 µl (2.6 U)	0.5 µl (2.5 U)
H ₂ O	hasta 25 µl (v _f)	hasta 25 µl (v _f)

Tabla 3. Características de las enzimas de alta fidelidad

El volumen final de reacción es de 50 µl para todas las amplificaciones: 25 µl de cada mezcla preparada por separado. La concentración final de MgCl₂ oscila entre 1.5 y 2 mM. El tiempo de elongación es de 45 s a 1 min, si el fragmento es menor o mayor a una kilobase, respectivamente. El proceso de PCR es idéntico para ambas enzimas y se podría resumir en los siguientes ciclos de temperatura y tiempo:

1 ciclo 2 min a 94 °C

10 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ s a } 94 \text{ °C} \\ 30 \text{ s a } X \text{ °C (} X = T_m \text{ del cebador} - 5 \text{ °C)} \\ (45 \text{ s} - 1 \text{ min)} \text{ a } 72 \text{ °C} \end{array} \right.$

15-20 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ s a } 94 \text{ °C} \\ 30 \text{ s a } X \text{ °C (} X = T_m \text{ del cebador} - 5 \text{ °C)} \\ (45 \text{ s} - 1 \text{ min)} \text{ a } 72 \text{ °C} + 5 \text{ s por cada ciclo de elongación.} \end{array} \right.$

1 ciclo 7 min a 72 °C

7.4.1. Adición de adeninas a fragmentos de PCR

En el caso de utilizar la polimerasa Pwo, es necesario adicionar al producto de PCR adeninas en los extremos si queremos clonarlo en vectores como el TOPO[®] o el pGEM-T[®]. Para ello llevaremos a cabo el siguiente protocolo:

1. Después de la amplificación, se añade a la muestra 0.7 - 1 µl de Taq Polimerasa. No es necesario cambiar el tampón de reacción.
2. Se incuba a 72 °C durante 8-10 min.
3. La muestra se extrae inmediatamente con un volumen de fenol:cloroformo.
4. Se añade a la fase acuosa 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto.
5. Se centrifuga a 13000 g durante 5 min a TA para precipitar el DNA.
6. Se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado con 1 ml de etanol 80% (v/v). Se seca el precipitado posteriormente al aire durante 1-2 min.
7. El DNA se resuspende en tampón TE 1x o en H₂O desionizada estéril.

Tampón TE: Ver apartado 3.3.

8. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR PCR

Para realizar las construcciones derivadas de la región 5' no codificante (5' UTR), descritas en el Capítulo 3 del presente trabajo, se utiliza la técnica de PCR, para introducir mutaciones puntuales en la secuencia del DNA. El esquema de trabajo se describe a continuación:

8.1. DISEÑO DE LOS CEBADORES

Sobre la región 5' UTR se diseñan dos cebadores específicos: BamHI-UTR y NdeI-UTR, complementarios a los extremos de la secuencia y en la orientación requerida para amplificar correctamente la región comprendida entre ambos (Figura 2). El fragmento obtenido, se clona direccionalmente en el vector puY1 en los sitios de restricción *Bam*HI y *Nde*I. Las secuencias reconocidas por estas enzimas se incluyen en cada uno de los cebadores respectivamente. Ambas T_m deben ser similares, en este caso están en torno a 63 °C.

Sobre la región que se quiere mutar, se diseña un cebador idéntico a la secuencia de DNA excepto en la zona donde se introduzca la mutación puntual. Estos cebadores tienen T_m superiores a la de los sintetizados para los extremos de la secuencia. Para cada uORF se diseñan dos cebadores complementarios entre sí: para la uORF1 el **E** y **F**; para la 2, el **G** y **H**; para la 3, el **I** y **J**; y para la 4 el **K** y **L**. Para mutar al mismo tiempo las uORFs 1 y 2, se diseñaron los cebadores **A** y **B**; y para mutar las uORFs 3 y 4, los cebadores **C** y **D**.

En la siguiente tabla se presentan las características de los cebadores sintetizados para este estudio:

Cebador	Secuencia	Bases	T_m
BamHI-UTR	5'CTTGGATCCTCGTCTGTCTTAC 3'	22	62.6 °C
NdeI-UTR	5'GCTCATATGGAAGGAAGACGT 3'	21	62.9 °C
Cebador-A	5'CCAAGGGGACGATCCGCAC 3'	19	72.0 °C
Cebador-B	5'GTGCGGATCGTCCCCTTGG 3'	19	72.0 °C
Cebador-C	5'AGATACCTGCCTTCGCCATTGAC 3'	23	71.7 °C
Cebador-D	5'GTCAATGGCGAAGGCAGGTATCT 3'	23	71.7 °C
Cebador-E	5'CCGCAGGGATGATCCGCAC 3'	19	72.9 °C
Cebador-F	5'GTGCGGATCATCCCTGCGG 3'	19	72.9 °C
Cebador-G	5'GGGCAATCCGCACATCCAC 3'	19	70.3 °C
Cebador-H	5'GTGGATGTGCGGATTGCC 3'	19	70.3 °C
Cebador-I	5'GCCGTATCATAAAGTTGCCTGCC 3'	23	72.4 °C
Cebador-J	5'GGCAGGCAACTTTATGATACGGC 3'	23	72.4 °C
Cebador-K	5'CCTTCGCCTTGGACCTGGG 3'	19	71.5 °C
Cebador-L	5'CCCAGGTCCAAGGCGAAGG 3'	19	71.5 °C

Tabla 4. Cebadores diseñados para la mutagénesis dirigida

El proceso para obtener el inserto mutado, consta de varios pasos sucesivos de amplificación. En todos ellos se utiliza la polimerasa Pwo (Roche), por lo que los procesos de amplificación por PCR se llevan a cabo según se describe en el apartado 7.4. En la siguiente figura se presenta un esquema de la región 5' no codificante, donde destacan dos pautas abiertas de lectura. Los cuadrados rojos simbolizan los ATG que se modifican puntualmente. Las flechas indican los cebadores diseñados y utilizados para el proceso de mutagénesis, así como su orientación.

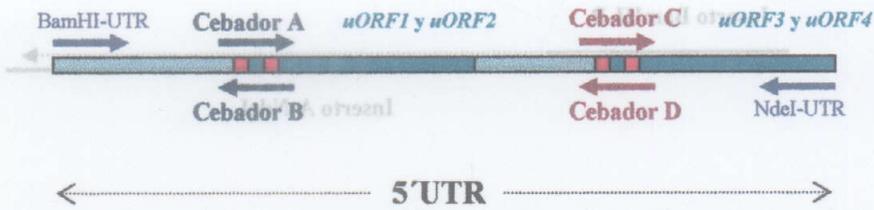
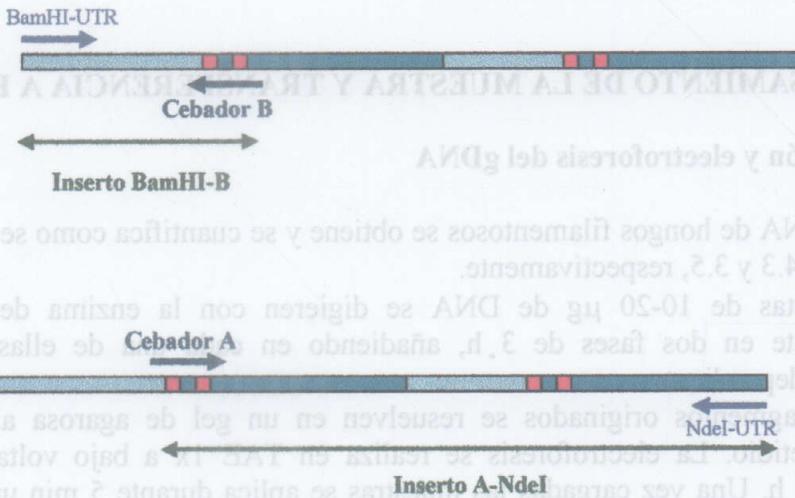


Figura 2. Situación de los cebadores sobre la 5' UTR

8.2. PRIMERA PCR

A continuación y como ejemplo, se presenta un esquema del trabajo efectuado para mutar puntualmente la uORF1 y 2 de la secuencia 5' no codificante. El llevado a cabo para la obtención del resto de construcciones, es idéntico.

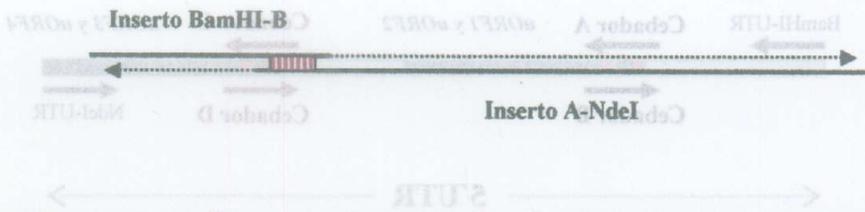
En primer lugar se realizan dos amplificaciones por separado sobre el mismo molde: por una parte con los cebadores BamHI-UTR y el Cebador B (generando el inserto BamHI-B); por otra con NdeI-UTR y el Cebador C (generando el inserto A-NdeI):



8.3. SEGUNDA PCR

Tras purificar por gel los insertos BamHI-B y A-NdeI, se realiza un segundo paso de PCR, donde se utilizan como DNA molde en la amplificación. Los cebadores utilizados en este caso son los diseñados para los extremos de la secuencia, esto es: BamHI-UTR y NdeI-UTR.

Tras el ciclo inicial de desnaturalización, se realizan 10 ciclos con la Tm de los cebadores A y B, para favorecer el acoplamiento de los insertos moldes por su zona homóloga:



Posteriormente se llevan a cabo 20 ciclos donde la T_m es la de los cebadores externos (BamHI-UTR y NdeI-UTR), lo que genera el inserto completo que incluye las mutaciones puntuales:



9. ANÁLISIS SOUTHERN (Hibridación DNA-DNA)

Estos experimentos se realizan hibridando DNA marcado radiactivamente con DNA fijado a un filtro, el cual puede proceder de fagos, bacterias, producto de una reacción de PCR, o bien DNA genómico.

9.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA Y TRANSFERENCIA A FILTRO

9.1.1. Digestión y electroforesis del gDNA

El gDNA de hongos filamentosos se obtiene y se cuantifica como se describe en los apartados 4.3 y 3.5, respectivamente.

Alicuotas de 10-20 μg de DNA se digieren con la enzima de restricción correspondiente en dos fases de 3 h, añadiendo en cada una de ellas una carga enzimática independiente.

Los fragmentos originados se resuelven en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. La electroforesis se realiza en TAE 1x a bajo voltaje (2V/cm) durante 18-24 h. Una vez cargadas las muestras se aplica durante 5 min una corriente alta de 100 V para promover la entrada de todos los fragmentos de DNA en el gel.

Al finalizar la electroforesis, el DNA se visualiza en el gel tras irradiarlo con luz ultravioleta. Los marcadores de peso molecular se señalan pinchando el gel con una aguja o una pipeta Pasteur de vidrio justo donde están localizados y se marca la señal con lápiz graso o con tinta china.

A continuación y antes de la transferencia, el DNA de doble cadena se desnaturaliza, equilibrando el gel durante 20-30 min en 0.4 N de NaOH.

9.1.2. Transferencia a membrana del DNA

Una vez incubado el gel en NaOH como se describe en el apartado anterior, se transfiere el DNA a un filtro o membrana de nylon (Hybond™-N⁺, Amersham Biosciences), cuya carga positiva facilita el proceso. El gel se coloca sobre un puente de papel Whatman 3MM empapado en 0.4 N de NaOH, cuyos extremos permanecen sumergidos en dicha disolución durante todo el proceso. Sobre el gel se coloca el filtro y sobre éste 4 ó 6 papeles 3MM, previamente humedecidos en la misma solución alcalina y evitando la formación de burbujas. Sobre el conjunto se dispone una pila de papel absorbente, sobre la que se coloca a su vez un peso de unos 500 g. La transferencia debe transcurrir al menos durante 8 h.

Una vez finalizada, el filtro se humedece en SSC 6x para neutralizar el pH y se deja secar a TA. Posteriormente el DNA se une covalentemente al filtro por irradiación con luz ultravioleta en un “cross-linker” CL-1000 (UVP, San Gabriel, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

SSC 20x: 3 M de NaCl, 0.3 M de Na₃Citrato·2H₂O. Se ajusta el pH a 7.0.

9.1.3. Transferencia de productos de PCR

Los productos de PCR se resuelven en geles de agarosa como se describe en el apartado 6.1. La transferencia y la fijación del DNA al filtro se realizan como se ha descrito previamente en el apartado 9.1.2.

9.1.4. Transferencia de DNA procedente de fagos

En este caso, las hibridaciones se llevan a cabo como parte del proceso del escrutinio de la genotecas de cDNA en λ-ZAP[®]II, y de la genoteca de gDNA en λ-GEM[®]11. Este procedimiento, así como la transferencia de los halos de lisis a los filtros y el posterior tratamiento del DNA previo a la hibridación, se detallan en el apartado 11.

Por otra parte, también se realizan en este trabajo hibridaciones sobre DNA purificado de fagos, el cual se obtiene como se describe en el apartado 4.2. Los fragmentos de DNA, generados tras digerir con las enzimas correspondientes, se separan en un gel de agarosa al 0.8% con una corriente de 10 V/cm de gel aproximadamente. La transferencia de los fragmentos a la membrana se realiza como se detalla en el apartado 9.1.2.

9.1.5. Transferencia de DNA procedente de colonias

Una forma de chequear si las colonias crecidas en medio selectivo portan el DNA de interés, es la hibridación con la sonda correspondiente *in situ*. Este método también es conocido como Grunstein & Hogness (Sambrook *et al.*, 1989). Antes de la hibridación de la membrana, se procede a la rotura celular para exponer el DNA y a su posterior desnaturalización, finalizando con un proceso de neutralización. El procedimiento es el siguiente:

1. Se coloca un filtro de nylon o nitrocelulosa sobre una caja de medio selectivo (LB+Amp100) en condiciones de esterilidad. El filtro se marca pinchándolo con una aguja de forma asimétrica y rotulando la placa en esos mismos puntos.
2. Paralelamente, se prepara una caja de medio selectivo sin filtro.
3. Las colonias se siembran de forma ordenada sobre la membrana y se realiza una réplica en el mismo orden en la caja carente de filtro.
4. Se incuban toda la noche a 37 °C.
5. La caja de medio con las colonias crecidas se almacena a 4 °C debidamente sellada hasta su posterior uso. De la otra caja retiramos el filtro con cuidado y se procede a su tratamiento como se detalla a continuación.
6. Se coloca la membrana, siempre con las colonias hacia arriba y sin formar burbujas, sobre papeles Whatman 3MM empapados en las siguientes soluciones y en el siguiente orden:

SDS 10%	10 min
Southern I	5 min
Southern II	5 min
SSC 2x	5 min

7. Se dejan secar los filtros a TA.
8. Se fija el DNA al filtro con ultravioleta si se tratan de filtros de nylon; o con vacío a 80 °C durante 1 h, en el caso de tratarse de nitrocelulosa.
9. Los filtros se guardan a TA hasta ser utilizados en el proceso de hibridación.

Southern I: 0.5 M de NaOH y 1.5 M de NaCl.

Southern II: 1 M de Tris-HCl pH 7.5 y 1.5 M de NaCl.

9.2. HIBRIDACIÓN Y LAVADOS

El filtro se sumerge en 15-20 ml de **solución de prehibridación** y se incuba durante al menos una h a 42 °C en un horno de hibridación (Hybaid™ micro-4), para bloquear los sitios de unión inespecífica presentes en las membranas.

La sonda radiactiva se prepara a partir de 50-100 ng de DNA. Para el **marcaje** se utiliza tanto el producto Oligolabellig Kit (Amersham Biosciences), como el producto Random Primed DNA Labelling Kit (Roche). Ambos protocolos conllevan la desnaturalización del inserto por calor, la posterior hibridación de las cadenas de DNA con cebadores de secuencia aleatoria y, finalmente, la síntesis de la cadena complementaria mediante la polimerasa Klenow en presencia de dATP, dTTP, dGTP y [α -³²P]dCTP. La reacción de síntesis ocurre a 37 °C durante 30 min-1 h.

El DNA marcado se separa del nucleótido libre, que puede unirse de forma inespecífica a la membrana, mediante cromatografía en columnas de Sephadex G-100 (preferible a G-50), donde por gravedad se separan dos fracciones que se detectan y siguen mediante un contador Geiger Müller. La primera fracción o pico contiene el inserto marcado, que se recoge en un microtubo. La segunda fracción, retrasada con respecto a la primera, contiene los nucleótidos libres y se descarta.

La sonda se desnaturaliza durante 5 min a 95 °C y, tras incubarla en hielo 2-3 min, se añade a 10-15 ml de solución de prehibridación nueva. El filtro se incuba entonces en la **solución de hibridación** durante al menos 8 h a 42 °C, evitando que se seque en algún momento.

Una vez finalizada la incubación, la solución se guarda a -20 °C protegida por un recipiente de vidrio y se procede al lavado de la membrana, para eliminar la hibridación inespecífica, como se detalla a continuación:

Solución de lavado I	20 min a RT
Solución de lavado I	20 min a 65 °C
Solución de lavado II	20 min a 65 °C

Tras los lavados el filtro se envuelve en papel transparente para mantenerlo húmedo y se expone a películas Kodak X-Ray Film o bien a películas ultrasensibles Kodak Biomax MS Film a -80 °C con pantallas intensificadoras.

Solución de prehibridación: 5x SSC, 0.2% de ficoll 400 (p/v), 0.2% de polivinilpirrolidona [PVP] (p/v), 0.1% de SDS, 0.2% de seroalbúmina bovina [BSA] (p/v) y formamida al 50% (v/v).

Solución de hibridación: Solución de prehibridación con la sonda radiactiva.

Solución de lavado I: 2x SSC y 0.1% de SDS.

Solución de lavado II: 0.2x SSC y 0.1% de SDS.

SSC 20x: Ver apartado 9.1.2.

En los experimentos de hibridación en condiciones menos restrictivas, el porcentaje de formamida usado en la solución de hibridación es del 35%, y los lavados se hacen a menor temperatura.

9.3 DESHIBRIDACIÓN DEL FILTRO

Para deshibridar la membrana, ésta se incuba con agitación con una solución hirviendo de 0.1% de SDS, hasta que la solución alcance la temperatura ambiente. Se comprueba si quedan restos de hibridación exponiendo el filtro a una película como se detalla en el apartado anterior.

10. ANÁLISIS NORTHERN (Hibridación DNA-RNA)

10.1 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE RNA. TRANSFERENCIA A FILTRO

La electroforesis del RNA total se realiza en geles de agarosa al 1.2 % con tampón **northern 1x** y 0.22 M de formaldehído, que mejora la resolución de la muestra. Para preparar el gel se funde primero la agarosa en el volumen de agua correspondiente, se deja enfriar un poco y se añade entonces el tampón northern y el formaldehído (en campana de extracción, ya que es tóxico).

Se analizan 10 µg de RNA total. Por cada 4.5 µl de RNA se añaden 15.5 µl de **RNA-Mix** y 3 µl de **tampón de carga 10x**. La muestra se calienta a 55-60 °C durante 5-10 min, para eliminar las estructuras secundarias. Se incuba posteriormente en hielo

durante 2-3 min y se carga en el gel. La electroforesis se lleva a cabo en tampón northern 1x y 0.22 M de formaldehído a 75 V.

Tras la electroforesis, el gel se lava durante 5 min en agua destilada, para eliminar parte del formaldehído y posteriormente se equilibra en solución SSC 20x durante 20 min. El RNA se transfiere por capilaridad a una membrana de nylon como se describe en el apartado 9.1.2, utilizando en este caso como solución de transferencia la misma con la que se equilibró el gel previamente. De igual forma, la membrana se irradia con luz ultravioleta para unir covalentemente el ácido nucleico al filtro.

La visualización del RNA transferido se realiza mediante una tinción reversible, que permite conocer la calidad de la transferencia y comparar la carga entre los distintos carriles. Para ello se sumerge el filtro en **solución de tinción** durante 2-3 min. Se retira la solución y se lava con abundante agua destilada hasta que se perciban nítidamente las bandas sobre la membrana. Con ayuda de un lápiz húmedo se marcan los pocillos y se orientan las muestras.

Tampón northern 10x: 0.2 M de MOPS, 80 mM de acetato sódico y 10 mM de EDTA. El pH se ajusta a 7.0 con ayuda de NaOH. Se esteriliza por autoclave, cambiando entonces a color amarillo.

Tampón de carga 10x: Ver apartado 6.2.

Solución de tinción: azul de metileno al 0.02% (p/v) en acetato sódico 0.3 M pH 5.5.

10.2. HIBRIDACIÓN Y LAVADOS

La hibridación y lavados de la membrana se realizan en las condiciones descritas en el apartado 9.2.

10.3. SLOT BLOT

Cuando son numerosas las muestras que queremos analizar, se chequean éstas mediante el Slot-Blot. Básicamente consiste en un colector con múltiples orificios idénticos entre sí, que permite depositar sobre una membrana un gran número de muestras. El tamaño de la muestra depositada es equivalente en todos los casos, por lo que se analiza la expresión diferencial de un gen por la señal de hibridación, sin cometer errores relacionados con el área de la muestra en sí depositada sobre el filtro.

En este trabajo, se ha utilizado un dispositivo comercial (Scheiler & Shuell), que consta de dos bloques de metacrilato, con 96 orificios distribuidos regularmente; sellados entre sí y conectados a una bomba de vacío. Entre ambos bloques se coloca la membrana sobre la que se depositan las muestras. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Se corta una porción de membrana de nylon equivalente al área del bloque. Se humedece el filtro en agua y se incuba en SSC 20x durante 1 h a TA.
2. Se lava el dispositivo con 0.1 N de NaOH y posteriormente con agua estéril.
3. Se colocan dos papeles de filtro humedecidos en SSC 20x sobre la zona de absorción.
4. Se coloca la membrana eliminando cualquier posible burbuja.
5. Se coloca el otro bloque del dispositivo sobre el filtro, se cierra herméticamente y se conecta a la bomba de vacío.

6. Se rellenan los huecos con SSC 10x y se aplica vacío hasta que pase completamente la solución a través del filtro. Se desconecta la bomba.
7. Se rellena de nuevo con SSC 10x.
8. Se preparan las muestras mezclando: 5 µg de RNA (en 10 µl de agua-DEPC), 20 µl de formamida 100%, 7 µl de formaldehído 37% y 2 µl de SSC 20x. El volumen final no es crítico. Las concentraciones finales son 50% de formamida (v/v), 7% de formaldehído (v/v) y 1x de SSC.
9. Se incuba la muestra durante 15 min a 68 °C y se pasa a hielo posteriormente.
10. Se añaden 2 volúmenes de SSC 20x a cada muestra.
11. Se conecta el vacío para que se filtre el SSC 10x depositado previamente. Se desconecta la bomba.
12. Se cargan las muestras en los pocillos. Se conecta de nuevo la bomba.
13. Se lava dos veces la muestra con 1 ml de SSC 10x.
14. Tras el segundo lavado, se continúa la absorción durante 5 min para secar la membrana.
15. Se desconecta el vacío, se seca el filtro al aire. Se fija covalentemente el RNA y se tiñe la membrana con azul de metileno como se detalla en el apartado 9.1.2. y 10.1 respectivamente.

11. ESCRUTINIO DE GENOTECAS

11.1. ESCRUTINIO DE LA GENOTECA DE gDNA EN λ-GEM[®]11

11.1.1 Preparación de la cepa hospedadora

1. Se refresca la cepa de *E. coli* LE392 en una placa de LB suplementada con 10 mM de MgSO₄. Se crece durante toda la noche a 37 °C.
2. Se inocula una de las colonias crecidas en la placa en 3 ml de LB con 10 mM de MgSO₄ y 0.2% de maltosa (p/v). Se incuba a 37°C con agitación toda la noche.
3. Se añade 1ml del preinóculo anterior a 50 ml de medio LB suplementado con MgSO₄ y maltosa.
4. Se incuba a 37 °C hasta que la OD₆₀₀ del cultivo esté entre 0.3-0.4.
5. Se centrifugan las células a 4 °C durante 10 min a 4000 g.
6. El sedimento de células se resuspende en 10 mM de MgSO₄ frío, de forma que la OD₆₀₀ sea de 0.5.
7. Las células se mantienen viables a 4 °C durante un par de semanas. Aunque para la transducción, los cultivos frescos son más eficientes.

11.1.2. Infección por el fago

1. Se realizan diluciones de la genoteca de 10⁻⁴, 10⁻⁶ y 10⁻⁸ para titular el contenido de fagos, haciendo un recuento del número de halos de lisis producidos sobre el césped bacteriano tras el proceso de infección y plaqueo en medio sólido. Se preparan 50 µl de la dilución que genere halos de lisis no confluentes, para poder aislar calvas.
2. Para la transducción, se mezclan 50 µl de la dilución correspondiente de fagos con 800 µl de la suspensión de bacterias LE392.
3. Se incuba la mezcla a 37 °C durante 30 min.

4. A la mezcla de fagos y bacterias se le añaden 3-4 ml de **agarosa de cobertera** precalentada a 42 °C y se extiende en una placa de medio LB suplementada con 10 mM de MgSO₄. Se deja enfriar 5 min a TA.
5. Una vez solidificado el agar, las cajas se incuban en posición invertida durante toda la noche a 37 °C. Para ralentizar el crecimiento de los halos se incuban a 30 °C.
6. Una vez que aparecen los halos de lisis, las placas se almacenan durante 10-15 min a 4 °C para que el agar se endurezca y sea más fácil la preparación de los filtros.

11.1.3. Preparación e hibridación de filtros

Para aislar los halos de lisis que contienen el DNA de interés, los fagos se transfieren a filtros y se analizan por hibridación cuáles generan una señal positiva. Para ello se procede de la siguiente manera.

1. El filtro de nylon se coloca sobre los halos de lisis, hasta cubrir la placa evitando la formación de burbujas. Se marca el filtro con un lápiz húmedo.
2. Con una aguja se realizan pinchazos asimétricos a través del filtro y el medio. Con ayuda de un transiluminador se visualizan las marcas de los pinchazos en la base de la caja y se rotulan.
3. Tras 1-2 min, se retira con cuidado el filtro de la caja. Se coloca de nuevo otro filtro, que sirve de réplica, y se marca de la misma forma pero con otro color para poder distinguirlo. Se coloca sucesivamente la membrana la membrana con los halos hacia arriba, sobre filtros 3MM empapados en las siguientes soluciones y en el siguiente orden :

Southern I	10 min
Southern II	10 min
SSC 2x	10 min

4. Se deja secar la membrana sobre papel de filtro con el DNA hacia arriba.
5. Se repite la misma operación con el filtro réplica.
6. Se fija el DNA covalentemente con luz ultravioleta, como se indica en el apartado 9.1.2. Si no se utilizan en el momento, las membranas se almacenan a TA, colocando papeles de filtro entre ellas.
7. Se procede a la hibridación como se indica en el apartado 9.2.

11.1.4. Aislamiento de los halos de lisis positivos

1. Tras revelar las películas expuestas, se verifica si las señales correspondientes a la hibridación aparecen en el filtro réplica, para descartar hibridaciones inespecíficas. Se seleccionan sólo las señales que aparecen en ambos filtros.
2. La película se posiciona sobre la caja correspondiente y con ayuda de un transiluminador, se seleccionan las calvas positivas en la hibridación.
3. Se aísla el halo de lisis con ayuda de una pipeta Pasteur o bien de una punta de micropipeta de 1 ml cortada.
4. A la porción de agarosa aislada se le añade 1 ml de **tampón SM**, para fluir los fagos; y un par de gotas de cloroformo, para eliminar las bacterias.
5. Los fagos eluidos en SM se almacenan a 4 °C.

Agarosa de cobertera: 7 g/l de agarosa en LB.

Tampón SM: Ver apartado 4.2.

Southern I y II: Ver apartado 9.1.5.

11.2. ESCRUTINIO DE LA GENOTECA DE cDNA EN λ -ZAP[®]II

En este caso se utiliza para la infección la estirpe de *E. coli* XL1-Blue MRF'. El proceso de obtención de células y de aislamiento de halos de lisis es similar al descrito en el apartado 11.1; excepto que las bacterias se refrescan antes de realizar el preinóculo, en medio LB suplementado con tetraciclina (12.5 μ g/ml). La obtención, titulación y amplificación de la genoteca, así como las características principales del vector utilizado se describen de forma más detallada en el apartado 22 de *Materiales y Métodos*.

El vector Uni-Zap XR (Stratagene), utilizado en la construcción de la genoteca de cDNA, permite obtener bacterias portadoras del DNA de interés a partir de los fagos positivos seleccionados en el escrutinio. A partir del vector, se obtiene por escisión el fagémido pBluescript con el cDNA clonado de forma dirigida.

Para ello, son necesarias las proteínas del fago ayudante o "helper" (ExAssist Helper Phage, Stratagene), que en este caso es el bacteriófago M13. Estas proteínas reconocen el iniciador que se halla en el vector. Una de estas proteínas genera un corte en el DNA a partir del cual comienza a sintetizarse una nueva cadena hasta la señal de terminación. La cadena sencilla se circulariza gracias al producto del gen II del fago M13. El DNA comprendido entre el iniciador y el terminador incluye la secuencia del fagémido pBluescript SK(-) y el inserto de cDNA clonado en el vector de lambda. Este proceso de "subclonaje", deja fuera todas las demás secuencias del vector original, ya que están fuera de la zona comprendida entre el iniciador y el terminador.

La cepa SOLR se utiliza en el proceso de escisión, ya que elimina cualquier problema de co-infección del fago "helper". El bacteriófago M13 posee una mutación ámbar, para la cual la estirpe SOLR no es supresora, lo que impide que se replique exitosamente en la bacteria.

11.2.1. Escisión *in vivo* por medio del sistema ExAssist/SOLR

Se utiliza el eluido de fagos obtenidos a partir de los halos de lisis positivos aislados en el escrutinio de la genoteca de cDNA. Las calvas se aíslan como se describe en el apartado 11.1.4. La obtención del fagémido a partir del fago lambda se detalla en el siguiente protocolo

1. Se refrescan las cepas XL1-Blue MRF' y SOLR en LB suplementado con tetraciclina y kanamicina respectivamente (apartado 2.1)
2. Se crecen las estirpes bacterianas en LB líquido con maltosa al 0.2 % (p/v) y 10 mM de MgSO₄, durante la noche a 30 °C.
3. Se centrifugan los cultivos a 1000 g. Se resuspende el precipitado de células en 10 mM de MgSO₄ hasta una OD₆₀₀ = 1.0.
4. Se mezclan en un tubo de polipropileno 200 μ l de XL1-Blue MRF' a OD₆₀₀ = 1.0, 250 μ l del eluido de fagos (que contenga aproximadamente > 1.10⁵ partículas víricas) y 1 μ l de fago ExAssist helper phage (>1.10⁶ pfu/ μ l).
5. Se incuba la mezcla a 37 °C durante 15 min.

6. Se añaden 3 ml de medio LB con maltosa y $MgSO_4$ y se incuban 2.5-3 h a 37 °C con agitación.
7. Se incuba durante 20 min a 65-70 °C y se centrifuga posteriormente a 1000 g durante 15 min.
8. En un tubo de polipropileno se recoge el sobrenadante. Éste contiene el fagémido escindido en forma de partículas de fago filamentoso. Puede almacenarse a 4 °C durante 1-2 meses.
9. Para la obtención de colonias portadoras del pBluescript con el cDNA de interés clonado, se añaden en dos microtubos 200 μ l de la suspensión fresca de SOLR preparada previamente. Se añaden 100 y 10 μ l, respectivamente, del sobrenadante de fagos obtenido en el apartado anterior.
10. Se incuba durante 15 min a 37 °C.
11. Se siembra una alícuota de cada tubo en placas de medio LB con ampicilina (50 μ g/ml). Se incuba durante la noche a 37 °C.

Las colonias que aparecen en la placa, portan el fagémido pBluescript en doble cadena, con el cDNA de interés clonado. La estirpe SOLR no es resistente a ampicilina, por lo que sólo las bacterias portadoras del vector crecen en el medio selectivo.

12. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

12.1. TRANSFORMACIÓN DE *E.coli*

12.1.1. Método químico

12.1.1.1. Preparación de células competentes

1. Se refresca la cepa de *E. coli* en una placa de LB con tetraciclina (12.5 mg/l). Se deja crecer durante la noche a 37 °C.
2. Se inocula una colonia en 5 ml de medio Ψ . Se crece el preinóculo a 37 °C con agitación hasta que la OD_{600} sea aproximadamente 0.3 (unas 2-3 h).
3. Se utiliza este precultivo para inocular 150 ml de medio Ψ precalentado a 37 °C. Se incuba con agitación vigorosa (250-350 rpm) hasta que la OD_{600} del cultivo sea 0.5 (aproximadamente 2.5-3 h).
4. El cultivo se transfiere a botellas de centrífuga de 200 ml, previamente enfriadas, y se incuba en hielo 2-3 min.
5. Se centrifuga en frío durante 10 min a 2500 g.
6. El precipitado de células se resuspende en 50 ml de **TFB I** frío. Se incuba en hielo durante 15 min.
7. Se centrifuga en frío durante 10 min a 2500 g.
8. Se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden suavemente en 10 ml de **TFB II** frío.
9. Se dispensan en alícuotas de 200 μ l en tubos de 1.5 ml previamente enfriados a -20 °C y se congelan rápidamente en N_2 líquido.
10. Los viales se almacenan a -80 °C. Se determina la eficiencia de transformación por μ g de DNA con un vector de concentración conocida.

Medio Ψ : 20 g/l de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 15 mM de $MgSO_4$ y 10 mM de KCl. Se ajusta el pH a 7.6 con KOH y se esteriliza en autoclave.

TFB I: 100 mM de RbCl, 50 mM de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 30 mM de acetato potásico, 10 mM de $CaCl_2 \cdot H_2O$ y glicerol al 15% (v/v). Se disuelven los reactivos en el orden indicado. El pH se ajusta a 5.8 con 0.2 M de ácido acético. Se esteriliza por filtración y se guarda a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

TFB II: 10 mM de MOPS, 10 mM de RbCl, 75 mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, glicerol al 15% (v/v). El pH se ajusta a 6.8 con NaOH. Se esteriliza por filtración y se guarda a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

12.1.1.2. Transformación por choque térmico

1. Las células competentes se descongelan en hielo. A continuación se mezclan con el DNA. La transformación se lleva a cabo al menos con 10 ng de DNA, el cual no debe sobrepasar 1/10 del volumen de la alícuota de las células.
2. Se incuba la mezcla 20 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$.
3. Se incuba la mezcla a $42\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min.
4. Se pasa inmediatamente a hielo y se mantiene en frío 2-3 min.
5. Se añade 1 ml de LB y se incuba a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min-1 h.
6. Se centrifuga durante 5 min a 5000 g.
7. Se elimina casi todo el sobrenadante, se resuspenden las células en el medio restante y se siembran en el medio de selección adecuado. Se incuba a $37\text{ }^\circ\text{C}$ al menos 8 h.

12.1.2. Electroporación

12.1.2.1. Preparación de células electrocompetentes

1. Se refresca en medio rico la cepa de *E. coli* que vaya a usarse. Se incuba durante la noche a $37\text{ }^\circ\text{C}$.
2. Se inocula una colonia en 20 ml de medio SOB sin magnesio.
3. Se diluye 1/100 en 500 ml del mismo medio. Se incuba con agitación vigorosa hasta que la OD_{600} sea de 0.8 (aproximadamente 3-4 h).
4. Se centrifuga el cultivo durante 5 min, a 5500 g y $4\text{ }^\circ\text{C}$, en botellas de 200 ml enfriadas previamente.
5. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 200 ml de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío.
6. Se centrifuga durante 7 min a 5500 g a $4\text{ }^\circ\text{C}$.
7. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 200 ml de glicerol al 10% estéril y frío.
8. Se centrifugan durante 15 min a 5500 g a $4\text{ }^\circ\text{C}$.
9. Las bacterias se resuspenden en 50 ml de glicerol al 10% estéril y frío.
10. Se centrifugan durante 10 min a 5500 g a $4\text{ }^\circ\text{C}$.
11. Se resuspende el sedimento en 6-8 ml de glicerol al 10% estéril y frío.
12. Las bacterias se dispensan en alícuotas de 200 μl y se congelan rápidamente en N_2 líquido.
13. Los viales se almacenan a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Se determina la eficiencia de transformación por μg de DNA con un vector de concentración conocida. Este método de transformación es más eficiente que el de choque térmico.

Medio SOB: 20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 0.5 g/l de NaCl, 5 ml de KCl 250 mM. Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH y se esteriliza en autoclave. Se añaden posteriormente 5 ml de $MgCl_2$ 2 M.

12.1.2.2. Transformación

1. Se descongelan las células electrocompetentes en hielo durante 15 min.
2. Se mezclan 5-10 μ l DNA (en agua estéril, sin contenido en sales) con las células competentes. Se incuban 5 min en hielo.
3. Se pasa la mezcla a la cubeta de electroporación (previamente enfriada a -20 °C). Se procura que quede en el fondo de la cubeta entre las dos láminas metálicas.
4. Se seca la cubeta y se electropora. Los parámetros de la electroporación dependen del tipo de cubeta y del microorganismo. En este trabajo se utilizan 2.5 KV, 200 Ω y 25 μ FD. El tiempo de electroporación debe estar en torno a 4.7-5 ms.
5. Se añade inmediatamente 1 ml de LB o cualquier otro medio rico y se pasa a un tubo de 1.5 ml.
6. Se incuba a 37 °C durante 45-60 min.
7. Se centrifuga 5 min a 5000 g y se siembra en medio selectivo.

12.2. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

Se utiliza el protocolo de transformación de levaduras en fase estacionaria, descrito por Chen *et al.* (1992). Consta de las siguientes etapas:

1. Para la obtención de biomasa se parte de medio sólido. Para ello, se refresca la cepa de levadura en medio YPD. Una vez crecidas las colonias, se rasca con una punta de micropipeta un grumo de biomasa, que permite realizar aproximadamente 5 transformaciones. La biomasa de un cultivo en medio líquido se obtiene de 1 ml de cultivo de OD₆₀₀ en torno a 2.0. Se centrifuga durante 10 segundos a 13000 g para recoger las células.
2. Una vez obtenida la biomasa, las células se lavan con 1 ml de H₂O destilada estéril. Se centrifuga a 13000 g durante 10 segundos.
3. Se resuspenden las células en el volumen deseado de agua, teniendo en cuenta que para cada transformación se usan 20 μ l de la suspensión (incluyendo el control sin transformar).
4. En un tubo de 1.5 ml, se mezclan 20 μ l de la suspensión y 1 μ g del plásmido con el que se quiere transformar (sin tratar con RNasa tras su obtención, ya que el RNA favorece el proceso de transformación).
5. Se añaden 2 μ l de DNA de **esperma de salmón** (10 mg/ml).
6. Se añaden 100 μ l de **tampón One-Step** y se mezcla inmediatamente.
7. La muestra se incuba 30 min a 42 °C.
8. Se añade posteriormente 1 ml de H₂O estéril y se centrifugan a 5000 g durante 3 min.
9. A continuación, se lavan las células con 1 ml de H₂O estéril.
10. Se centrifugan a 5000 g durante 3 min y se siembra el sedimento en el medio selectivo adecuado (el control sin transformar se siembra en medio rico).

Esperma de salmón: Se disuelve DNA de esperma de salmón tipo III (Sigma) en TE pH 8.0 a una concentración final de 10 mg/ml. Se deja toda la noche a 4 °C. Se sonica durante 10 segundos a 100 W. Posteriormente se añade un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se agita vigorosamente y se centrifuga 10 min a 10000 g. Se recoge la fase acuosa y se extrae con cloroformo. Se centrifuga de nuevo durante 30 min. Se recoge la fase acuosa y se añade 1/10 del volumen de acetato

sódico 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incuba a -20 °C durante 30 min. Se centrifuga posteriormente 10 min a 10000 g y se lava el precipitado con 1 ml de etanol 70%. Se resuspende en TE hasta una concentración final de 10 mg/ml. Se incuba durante 20 min a 100 °C y se enfría en hielo. Se dispensa en alícuotas y se almacena a -20 °C.

Tampón One-Step: 0.2 M de acetato de litio, PEG 6000 (o en su defecto PEG 3350) al 40 % (p/v), 100 mM de DTT. Los componentes se preparan por separado en soluciones concentradas que se esterilizan por filtración. Se suelen preparar antes de usarlos, aunque también pueden guardarse a -20 °C.

12.3 TRANSFORMACIÓN DE *T.harzianum*

El proceso de transformación de *T. harzianum* se realiza siguiendo el protocolo descrito por Penttilä *et al.* (1987). El método consta de dos partes: una primera en la que se obtienen y purifican protoplastos a partir de micelio joven y una segunda en la que los protoplastos se cotransforman con dos plásmidos. Por un lado, con el vector p3SR2, portador del marcador de selección; que en este caso es el gen *amdS* de *A. Niger*, que codifica la acetamidasa. Por otro, con la construcción de interés, que en este trabajo ha sido: pLMRS3, pLMRS3-GLA66, pZEGA1, pZEGA33, pRLMex60 y pMDJ1. El protocolo se detalla a continuación

12.3.1. Obtención de protoplastos

1. Se utilizan 20 cajas de PPG por transformación, cubiertas por discos de celofán previamente preparados como se describe en el apartado 2.3.2.
2. Se inoculan de $3-5 \cdot 10^6$ de esporas de *Trichoderma* por caja de medio. La dilución de esporas se prepara previamente en NaCl al 0.9 % (p/v).
3. Se incuban las cajas a 28 °C durante 16-20 h, hasta que se percibe el micelio sobre el celofán.
4. Se transfieren los celofanes a una caja Petri de 15 cm de diámetro que contiene 15-20 ml **solución de enzimas líticos** de pared. Se agitan suavemente los celofanes con una pinza hasta que el micelio se desprende.
5. Se incuban de 2 a 3 h a 30 °C con agitación suave. La formación de los protoplastos se sigue mediante el microscopio.
6. Se filtra la suspensión de protoplastos a través de lana de vidrio. Se lava la lana con 10 ml de la solución anterior (carente en este caso de los enzimas).
7. Se añade un volumen de 0.6 M de sorbitol-0.1 M de Tris-HCl pH 7.0 evitando que se mezclen las fases y se centrifuga a 4000 g durante 15 min, en un rotor basculante.
8. Se recogen con ayuda de una pipeta Pasteur los protoplastos, que se localizan en la interfase formada. Se añade un volumen de 1.2 M de sorbitol-10mM de Tris-HCl pH 7.5 y se centrifuga a 4000 g durante 5 min en una centrifuga de rotor basculante a 15-18°C.
9. Se lava el precipitado dos veces repitiendo el paso 8.
10. Se resuspenden en 400-800 µl de 1.2 M de sorbitol-10mM de CaCl₂ 10 mM de Tris pH 7.5. El número de protoplastos se determina en una cámara de Burker.
11. Para seguir el grado de regeneración se siembra una dilución de los protoplastos en **medio no selectivo**.

12.3.2. Cotransformación de protoplastos

1. Se mezclan 20 μ l de la solución de DNA en TE (3-5 μ g p3SR2 y 10 veces más del vector que porta la construcción de interés) y 200 μ l de solución de protoplastos ($5 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^6$) en un tubo de 10 ml. Como control, se mezclan 200 μ l de protoplastos con 20 μ l de TE.
2. A continuación se añaden lentamente 50 μ l de 25% PEG 6000-50mM CaCl₂-10 mM Tris pH 7.5 y se incuba la mezcla 20 min en hielo. Posteriormente, se añaden 2 ml de la solución anterior y se homogeniza por inversión. Se incuba 5 min a TA.
3. Finalmente, se añade a la mezcla de transformación 4 ml de sorbitol-CaCl₂-Tris.
4. Se siembran distintas diluciones (en un volumen final de 100 μ l) de los transformantes y del control en **medio selectivo** y no selectivo, respectivamente, mezclándolos con agar de cobertera a 50°C.
5. Tras 5-10 días comienzan a aparecer las colonias de los transformantes, los cuales se pasan a un medio de estabilización o **medio selectivo con Tritón X-100**. Estos subcultivos se realizan un mínimo de cuatro veces antes de transferir los transformantes a medio no selectivo.

Solución de enzimas líticos: Se prepara una solución 10 mM de fosfato sódico pH 5.8 y 1.2 M de MgSO₄. Posteriormente se le añaden enzimas líticos de pared (Lysing Enzymes, Sigma) a una concentración de 5 mg/ml.

Medio no selectivo: MM como se describe en el apartado 2.3.2, con 20 g/l de glucosa y 182.2 g/l de sorbitol (1 M). Para medio sólido, se añaden 18 g/l de agar y para agar de cobertera se añaden 30 g/l, el cual se mantiene a 50 °C tras fundirlo.

Medio selectivo: MM como se describe en el apartado 2.3.2, con 20 g/l de glucosa y 1M de sorbitol. Para medio sólido, se añaden 18 g/l de agar noble (Difco). Para agar de cobertera se añaden 30 g/l de agar noble. Después de esterilizarlo por autoclave, se añaden CsCl hasta 12.5 mM y acetamida hasta 10 mM. El agar de cobertera se mantiene a 50 °C tras fundirlo.

Medio selectivo con Tritón X-100: MM como el descrito en el párrafo anterior pero sin sorbitol y con Tritón X-100 a una concentración final de 0.1% (v/v). Este medio se utiliza para la estabilización de los transformantes.

13. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

13.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

13.1.1. Extracción de proteínas totales

13.1.1.1. De bacterias

1. Se utiliza 1 ml de un cultivo que está al final de la fase exponencial. Se toma 1 ml y se centrifuga a 13000 g durante 30 segundos.
2. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 100 μ l de tampón **Laemmli 2x** (Laemmli, 1970).
3. Se incuba la mezcla a 95 °C durante 5 min.
4. Se centrifuga posteriormente a 13000 g durante 1 min.

5. Se recupera el sobrenadante, que contiene las proteínas solubles, y se guarda a -80°C . El precipitado contiene restos celulares.

Tampón Laemli 2x: 160 mM de Tris-HCl pH 8.0, 20 % de glicerol (v/v), 2% de SDS, 10% de β -mercaptoetanol (v/v). Antes de cargar la muestra en el gel, se le añade azul de bromofenol al 0.1% (p/v).

Nota: Para preparar tampón Laemmli 4x se mezclan en un volumen final de 10 ml: 2.1 ml de SDS al 20 % (p/v), 2.5 ml de Tris-HCl 1M pH 6.8, 1 ml de β -mercaptoetanol y 4.6 ml de glicerol.

13.1.1.2. De levaduras

1. Se toma 1 ml de cultivo con una OD_{600} de 0.8.
2. Se centrifuga 30 segundos a 13000 g y se elimina el sobrenadante.
3. El sedimento de células se lava dos veces con agua destilada estéril.
4. Las levaduras se resuspenden en 100 μl de **tampón YEB** en frío y se pasan a un tubo de 5 ml. Se añade PMSF hasta una concentración final de 1 mM y 1/3 del volumen de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro (enfriadas previamente a -20°C).
5. Se agita vigorosamente la mezcla en 4 ciclos de 30 segundos cada uno. Entre cada ciclo, se incuba la mezcla 2 min en hielo.
6. Se recoge el sobrenadante y se pasa a un tubo de 1.5 ml.
7. Se centrifuga a 13000 g durante 15 min a 4°C . El sobrenadante se almacena a -80°C hasta su uso.

Tampón YEB: 50 mM de KH_2PO_4 pH 7.8, 1 mM de DTT e inhibidores de proteasas Complete™ (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) a concentración final 1x. El PMSF se añade justo antes de la rotura con las perlas de vidrio, debido a su inestabilidad a pH neutro.

13.1.1.3. De *T. harzianum*

*Para la obtención de proteínas de la fracción soluble se procede de la siguiente manera:

1. Se pulveriza el micelio en un mortero y en presencia de nitrógeno líquido.
2. Se resuspende en 3 volúmenes de **tampón de extracción**.
3. Se homogeniza a TA, mezclando por inversión varias veces
4. Se centrifuga a 5000 g durante 5 min para retirar el material insoluble. Se guarda el sobrenadante a -80°C .

Tampón de extracción: 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de glicina e inhibidores de proteasas Complete™ (Roche) a concentración 1x.

*Para obtener proteínas totales a partir de micelio pulverizado:

1. Se resuspende la muestra con 5 volúmenes de tampón Laemmli 2x, o bien de 6 M de urea.
2. Se incuba durante 5 min a 95°C .
3. Se centrifuga el extracto a 5000 g durante 5 min para eliminar el material no

solubilizado.

4. Se guarda el sobrenadante a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

13.1.1.4. De material vegetal

Se pulveriza el material en presencia de nitrógeno líquido, se resuspende en tampón Laemmli 2x y se incuba a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Tras centrifugar la muestra como en los casos anteriores, se recupera el sobrenadante y se almacena a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

13.1.2. Obtención de proteínas extracelulares de *T. harzianum*

En determinados experimentos de inducción de *Trichoderma*, se requiere el análisis de la fracción proteica extracelular. El protocolo seguido se detalla a continuación

1. Se filtra el cultivo, tras el período de inducción, como se describe en el apartado 2.3.2.; separando el micelio del medio de cultivo.
2. Se recoge el sobrenadante y se le añade $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una concentración final del 52 %.
3. Se incuba a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ al menos 2 h.
4. Se centrifuga a 13000 g durante 30 min.
5. Se retira el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1 ml de agua destilada estéril.
6. Se dializa 18-24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, frente a agua estéril o frente al tampón requerido en el caso de medir posteriormente una actividad enzimática concreta. Para ello se utilizan tripas de diálisis (Dialysing Tubing, Sigma).
7. Se recupera el contenido de la tripa con una micropipeta y se centrifuga durante 5 min a 13000 g.
8. El sobrenadante se almacena a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tripas de diálisis: Para su preparación, se cortan porciones de unos 10-20 cm aproximadamente. Se hierven durante 10 min en bicarbonato sódico al 2% (p/v) y 1 mM de EDTA pH 8.0. Se lavan las tripas con agua destilada y se hierven de nuevo en 1 mM de EDTA pH 8.0. Una vez frías se almacenan a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de utilizar cada tripa, se lava por dentro con agua estéril antes de introducir la muestra.

13.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El procedimiento para cuantificar las proteínas contenidas en una solución, depende de la composición del tampón en el que se encuentren. En este trabajo, se han utilizado los dos métodos detallados a continuación.

13.2.1. Método de Bradford

El método de Bradford (1976) es rápido y sencillo, pero no se utiliza con muestras proteicas que contengan detergentes (SDS, Tritón X-100 ó NP-40) a concentraciones superiores al 0.2%, como el tampón Laemmli.

Para la cuantificación, se añaden 20 μ l de muestra a 1 ml de **solución Bradford**. Paralelamente y del mismo modo, se realiza una **recta patrón** de referencia con 0, 1, 2, 5, 10 y 15 μ g de BSA. Se mide la OD a 595 nm. Los valores de absorbancia de las muestras se extrapolan a la concentración de proteínas en la **recta patrón**.

Solución Bradford: Se diluye la solución Bradford 5x (BioRad) en agua destilada 1:5.

13.2.2. Método de Lowry modificado

Este método permite determinar la concentración de proteínas en soluciones con detergentes. El método, inicialmente descrito por Lowry (1951), fue posteriormente modificado por Bensadoun y Weinstein (1976). Se procede de la siguiente forma:

1. Se añaden 5-10 μ l de muestra a 600 μ l de agua desionizada estéril.
2. Se añaden 5 μ l de una solución de deoxicolato sódico al 2% (p/v). Se agita la mezcla y se incuba durante 15 min a TA.
3. Se añaden 200 μ l de una solución de TCA al 24% (p/v) para precipitar las proteínas. Se mezcla bien y se centrifuga posteriormente a 6500 g durante 30 min a TA.
4. Se resuspende el precipitado en 1.4 mL de **reactivo D**. Se añaden inmediatamente 100 μ l de Folin-Ciocalteus (Merck, Darmstadt, Alemania) diluido 1:1 en agua.
5. Tras incubar 45 min en oscuridad, se mide la absorbancia a 660 nm. La concentración de proteína se extrapola a partir de los valores obtenidos para la **recta patrón** llevada en paralelo.

Reactivo C: 20 g de CO_3Na , 10 ml de Tartrato NaK al 2% (p/v), 6.2 ml de NaOH 16 N. Se disuelve en primer lugar el CO_3Na en 900 ml de agua, y se añaden posteriormente el resto de los componentes. Se completa el volumen hasta 1 litro.

Reactivo D: 50 ml de reactivo C, 0.5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1.4% (p/v). Se prepara inmediatamente antes de su uso.

13.3 ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

Las proteínas se separan por su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (1970). Las muestras se resuelven en un sistema discontinuo consistente en un **gel de apilamiento** ("stacking") y un **gel de separación**, en un equipo Mini Protean[®] II (BioRad) a un voltaje constante de 200 V. El tiempo de electroforesis dependerá de la resolución requerida en las muestras, según el porcentaje de acrilamida que contenga el gel.

Las muestras se preparan en tampón de carga Laemmli 1x, se incuban durante 5 min a 95 °C y se disponen en el gel, cubierto con **tampón de electroforesis**. Como patrón de peso molecular se usa el marcador comercial Broad Range (BioRad).

Gel de apilamiento: 125 mM de Tris-HCl pH 6.8, 0.1% de SDS, A/B (3.8 % de acrilamida, 0.2% de bisacrilamida), 0.05% de persulfato amónico (APS) y 0.1% de TEMED.

Gel de separación: 375 mM de Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % de SDS, A/B (29.2% de

acrilamida, 0.2% de bisacrilamida) hasta el porcentaje adecuado, 0.05% de APS y 0.05% de TEMED.

Tampón de electroforesis: 25 mM de Tris, 194 mM de glicina y 0.1% de SDS.

13.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL

Para detectar las proteínas tras la electroforesis, se introduce el gel durante 30 min en **solución de tinción** a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, el gel se pasa a **solución de destinción** hasta que se visualizan las bandas.

Para conservar un gel teñido, se puede envolver entre dos celofanes húmedos y dejar aproximadamente unas 12 h, hasta que se seque el conjunto. Se recorta entonces el celofán sobrante y se guarda el gel.

Solución de tinción: Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma) al 0.25 % (p/v) en 50% de metanol (v/v) y 10% de ácido acético (v/v).

Solución de destinción: 10% de ácido acético (v/v) y 40 % de metanol (v/v).

14. ANÁLISIS WESTERN (Inmunodetección de proteínas en membrana)

El método, originalmente descrito por Towbin (1979), permite detectar mediante el uso de un anticuerpo, el antígeno correspondiente unido a una membrana. Así pues, es posible determinar la presencia o ausencia del antígeno, su proporción con respecto a la mezcla total e incluso la cantidad relativa entre distintas muestras. Para su realización, las proteínas resueltas en la electroforesis se transfieren a membrana.

14.1. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA

En este trabajo, la transferencia de las proteínas se realiza mediante método semi seco, utilizando el sistema Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell (BioRad). Los extractos proteicos resueltos por electroforesis se transfieren a filtros de nitrocelulosa o de difluoruro de polivinilideno (PVDF, o Immobilon[®] -Millipore-). Para ello se procede de la siguiente forma:

1. Se elimina del gel la porción correspondiente al gel de apilamiento con ayuda de un bisturí.
2. Se incuban el gel, 6 papeles Whatman 3MM y el filtro durante 5 min con agitación suave en **tampón de transferencia**. Si la membrana es de PVDF, se introduce en metanol previamente a la incubación.
3. Se humedecen las placas del Transblot SD con agua destilada.
4. Se coloca en el siguiente orden: 3 papeles Whatman 3MM, la membrana, el gel y los otros 3 papeles restantes, evitando la formación de burbujas.
5. Se coloca la otra placa encima y se cierra el sistema.
6. Se realiza la transferencia durante 30-45 min a 15 V.
7. Para visualizar las proteínas transferidas a la membrana, se incuba el filtro durante 1 min en solución **Ponceau S** y se lava posteriormente con abundante agua destilada

hasta que se detecten las bandas. Se señalan con un lápiz húmedo el marcador de peso molecular, las proteínas mayoritarias y la orientación de las muestras.

Tampón de transferencia: 192 mM de glicina, 25 mM de Tris y 20% de metanol (v/v).

Solución Ponceau S: 0.5% de Ponceau S [Sigma] (p/v) en ácido acético al 1% (v/v).

14.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

El proceso consta de dos partes fundamentalmente: una es el reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo sintetizado frente a él; y la otra, el reconocimiento del complejo antígeno-anticuerpo formado, por el denominado anticuerpo secundario. Éste último va conjugado a una enzima que permite detectar la presencia del complejo de hibridación formado y en definitiva, la localización de la proteína de interés, gracias a la actividad enzimática que se lleva a cabo. En este trabajo, se han utilizado anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP), que genera emisión de luz al actuar sobre un sustrato comercial. A continuación se detalla un protocolo estándar:

1. Se bloquea el filtro durante 1 h a TA o bien durante toda la noche a 4 °C con **solución de bloqueo**.
2. Se incuba el filtro en solución de bloqueo con el anticuerpo primario a la dilución adecuada, durante 1 h y 30 min, en agitación suave a TA.
3. Se lava la membrana durante 5-10 min con **TBS-T**. Se repite este proceso dos veces más.
4. Se incuba en TBS-T con el anticuerpo secundario a la dilución adecuada (1:10000, normalmente), durante 50 min.
5. Se lava la membrana durante 5-10 min con TBS-T, tres veces.

Para la detección mediante la reacción enzimática se utiliza el producto ECL™ Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los dos reactivos de este producto se mezclan en proporción 1:1 y se incuba la membrana lavada durante 1 min con dicha solución. Posteriormente, se expone el filtro a películas autorradiográficas a distintos tiempos.

Solución de Bloqueo: 1x de TBS, leche desnatada (Molico Sveltesse, Nestlé) al 5% (p/v) y Tween-20 al 0.2% (v/v).

TBS 10x (Tris buffered saline): 80 g/l de NaCl, 2 g/l de KCl y 30 g/l de Tris-base. El pH se ajusta a 8.0 con HCl.

TBS-T: TBS 1x y Tween-20 al 0.2% (v/v).

14.3. DESHIBRIDACIÓN DE FILTROS

Un filtro puede ser reutilizado para un ensayo western distinto. Para ello es conveniente deshibridar la membrana, eliminando el anticuerpo unido de forma específica a la proteína. Se lleva a cabo según el siguiente protocolo:

1. Se introduce la membrana en la **solución de deshibridación**. Si el filtro es de PVDF, se hidrata previamente con metanol.
2. Se incuba a 55 °C durante 30-60 min, agitando ocasionalmente.
3. Se realizan dos lavados de la membrana, de 10 min cada uno, con TBS-T.
4. A continuación el filtro se bloquea o se guarda a TA, una vez seco, hasta su uso.

Solución de deshibridación: 100 mM de β -mercaptoetanol, 2% de SDS, 62.5 mM de Tris-HCl pH 6.7.

15. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-GLA66

15.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGO

Los vectores de expresión de la serie pGEX están diseñados para la expresión en bacterias de polipéptidos fusionados a la proteína glutatión-S-transferasa (GST). La clonación se efectúa en dianas situadas tras la secuencia codificante de la proteína GST, precedidas por un sitio específico de proteasas. Existen versiones del vector con diferentes fases de lectura en los sitios de clonación y sitios específicos para proteasas diferentes (trombina y factor Xa).

Los vectores pGEX tienen el gen que codifica la GST bajo el control de un promotor *ptac* inducible químicamente y un gen *lac I^q* para dar independencia del huésped al plásmido. El represor *lac*, producto del gen *lac I^q*, se une al promotor *ptac*, reprimiendo la expresión de la proteína de fusión GST. Cuando se añade IPTG, la expresión a partir del promotor *ptac* se desreprime, expresándose la proteína híbrida.

15.2. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS TRANSFORMANTES

El fragmento de DNA que codifica el péptido de interés se clona en el vector apropiado de la serie pGEX, se transforman células competentes de *E. coli* y se seleccionan los transformantes en cajas con LB+Amp100. Las cajas se incuban de 12 a 15 h a 37°C. A continuación:

1. Se inoculan colonias transformantes en tubos independientes, con 2 ml de LB+Amp100 cada uno. Como control se inocula una colonia que porte únicamente el vector pGEX. Se incuban durante 3-5 h a 37°C con agitación.
2. Para la inducción de la proteína de fusión, se añade **IPTG** hasta una concentración final de 0.1 a 1 mM.
3. Se continúa la incubación durante 1-2 h.
4. Se centrifugan los cultivos durante 20 segundos a 13000 g, y se resuspende el sedimento de células en 100 μ l de tampón Laemmli 2x.
5. Se incuba 5 min a 95°C y se centrifuga durante 5 min a 13000 g, para eliminar los restos celulares.
6. Se analiza el sobrenadante en un gel de poliacrilamida. Se tifican posteriormente las proteínas con azul de Coomassie y se eligen aquellos transformantes que expresen la proteína tras la inducción con IPTG.

IPTG: Se prepara una disolución concentrada 100 mM de isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) en agua destilada. Se esteriliza por filtración y se almacena a -20 °C.

Nota: En los experimentos de inducción, el medio LB puede sustituirse por el medio 2xYTA, con ampicilina a la misma concentración. Para el mantenimiento de la cepa transformada así como para la selección de los transformantes en medio sólido, puede utilizarse el medio 2xYTG con ampicilina que, al portar glucosa, reprime la expresión de la proteína de fusión, la cual puede resultar tóxica para la célula.

Medio 2xYT: 16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl. Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH. Para medio sólido, añadir 15 g/l de agar. El antibiótico se añade después de autoclavar el medio.

Medio 2xYTG: Idem, pero portando glucosa a concentración final del 2%.

15.3. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-GLA66

Las proteínas de fusión se purifican a partir de lisados celulares por adsorción a Sepharosa 4B-glutación (Amersham Biosciences). La purificación se realiza, por tanto, en condiciones no desnaturizantes. Para la realización del proceso se siguen las indicaciones recomendadas por el fabricante:

1. Se inocula una colonia transformante en 100 ml LB+Amp100 y se incuba 12-15 h a 37°C con agitación.
2. Se diluye el cultivo 1:10 en 1 litro de LB+Amp100, repartiendo el volumen en dos matraces de 2 litros, y se incuba 1 h a 37°C.
3. Se añade **IPTG** a una concentración final de 1 mM y se continúa la incubación durante 3-7 h.
4. Se centrifuga el cultivo 10 min a 5500 g para sedimentar las células. El sedimento se resuspende en 40 ml de **PBS 1x** frío.
5. Se lisan las células por sonicación. La lisis de las células va asociada al cambio de aspecto de la solución, que pasa de tener un color amarillento a grisáceo.
6. Se añade Tritón al sonificado hasta una concentración final del 1% (v/v), y se mezcla con agitación suave durante 30 min para solubilizar la proteína.
7. Se centrifuga a 9500 g, durante 15 min y a 4°C para eliminar el material insoluble y las células intactas.
8. El sobrenadante, se incuba entonces durante 20 min con 0.5-1 ml de Sepharosa 4B-glutación, equilibrada en PBS+1% Tritón X-100.
9. Se lava la Sepharosa con 10 volúmenes de PBS. Se centrifuga a 500 g durante 5 min en una centrifuga de mesa.
10. Para determinar la eficiencia del proceso, se analiza una alícuota en gel SDS-PAGE. La proteína pasa al gel de separación mientras que el resto del complejo queda retenido en los pocillos. El extracto se almacena a -80 °C.

PBS 10x (Phosphate buffered saline): 80 g/l de NaCl, 2 g/l de KCl, 14.4 g/l de Na₂HPO₄, 2.4 g/l de KH₂PO₄. El pH se ajusta a 7.2.

16. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

A partir de un suero, se puede purificar un anticuerpo concreto en mayor o menor grado. Para ello, la proteína a la cual reconoce específicamente se transfiere a un filtro,

que se corta en tiras y se almacena a TA hasta su uso. Para el proceso de purificación se realizan los siguientes pasos:

1. Se incuba la tira 1 h a TA en solución de bloqueo (0.25 ml/cm² de filtro).
2. Se añade el anticuerpo primario en dilución 1:500 ó 1:1000 y se incuba 5 h a TA o bien 16 h a 4 °C con agitación.
3. Se elimina la solución y se lava con 0.15 M de NaCl durante 20 min a TA.
4. Se lava el filtro con PBS 1x durante 20 min a TA.
5. Como control, se corta una porción de una de las tiras y se incuba con el anticuerpo secundario adecuado. Se comprueba posteriormente por inmunodetección si la unión es específica (apartado 14.2).
6. El resto de las tiras se colocan sobre un trozo de Parafilm que cubre una caja Petri; la cara con la proteína transferida se orienta hacia arriba.
7. Se añaden de 200 µl a 500 µl de **tampón de elución**.
8. Se incuba durante 20 min a TA en un lugar húmedo (por ejemplo en una cámara de cultivo).
9. Se transfiere el eluido a un tubo y se neutraliza rápidamente añadiendo 0.1 volúmen de **Tris-base 1M**. El pH se chequea con ayuda de una tira de medición de pH.
10. Se añade 0.1 volúmen de PBS 10x y **azida sódica** hasta una concentración final del 0.02% (p/v). Se almacena a 4 °C.

PBS 10x: Ver apartado 15.3.

Tampón de elución: 0.2 M de glicina pH 2.8, 1 mM de EGTA.

Azida sódica: Se prepara una solución concentrada al 2 % (p/v) en agua desionizada. Se filtra y se guarda a TA.

17. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

17.1. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LÍTICA SOBRE PAREDES CELULARES DE *Trichoderma*

Para la realización de estos ensayos se añade al medio de cultivo una solución de enzimas líticas hasta una concentración final de 2 mg/ml (Lysing Enzymes, Sigma), que actúan durante 8 h sobre el micelio (Capítulo 3 de este trabajo). Posteriormente, se toman muestras del cultivo para visualizarlas al microscopio.

Las enzimas se preparan en una solución concentrada que se esteriliza por filtración.

17.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD GLUCOSA OXIDASA

La determinación de la actividad glucosa oxidasa en los sobrenadantes de los diferentes cultivos se realiza según el protocolo descrito por Geisen (1995). La mezcla de ensayo contiene 1 mM de ABTS [2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina sulfonato)] (Sigma), 1U/ml de peroxidasa HRP (horse radish peroxidase, Roche) y 250 mM de glucosa en 100 mM de fosfato sódico pH 5.8. El incremento de absorbancia se mide de forma continua en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm. Una unidad de actividad enzimática se considera como la cantidad de enzima requerida para que se oxide 1 µmol de glucosa por min a pH 5.8 y a 25 °C.

En esta reacción la glucosa oxidasa actúa sobre la molécula de glucosa generando H_2O_2 , que se hidroliza por la peroxidasa HRP liberando al medio radicales libres de oxígeno, que actúan sobre el ABTS, virando la solución a color verde.

Se toman alícuotas de 300 μ l a partir del sobrenadante de los diferentes cultivos a tiempos concretos, según el estudio realizado. Se centrifuga la muestra durante 1 min a máxima velocidad para eliminar posibles restos de micelio. Posteriormente, se toman 100 μ l y se mezclan con la peroxidasa y con el ABTS. El cero o blanco de la muestra se hace a partir de esta mezcla, ya que es necesario considerar cualquier traza de glucosa que proceda del medio de cultivo. Una vez estabilizada la medida en el espectrofotómetro, esto es, una vez realizada la medida cero, se le añade glucosa exógena como sustrato. A continuación se anotan los valores, medidos a 420 nm durante dos min y en intervalos de 30 segundos, para determinar la actividad considerando la zona de incremento lineal de la absorbancia.

17.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUITINASA

El ensayo de actividad quitinasa se determina utilizando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil-N, N', N'', N''' - tetraacetilquitotetraosa [4-MU- (GINAc)₄] (Sigma). Este sustrato se hidroliza por la quitinasa, liberándose el producto fluorescente 4-metilumbeliferona (Umb), que se cuantifica en un fluorímetro Hoefer, TKO100. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. El material vegetal, hojas de planta adulta, se pulveriza en N₂ líquido.
2. Al material triturado se le añade un volumen de tampón fosfato-Na 50 mM pH 6.0, se homogeniza y se centrifuga a 13.000 g durante 10 min.
3. Se determina la concentración de proteínas del sobrenadante mediante el ensayo Bradford.
4. Se mezcla 1 μ g de proteína total en 20 μ l de tampón fosfato con 80 μ l de **solución 4-MU- (GINAc)₄**. Se incuba durante 15 min a 30 °C en oscuridad.
5. La reacción se detiene añadiendo 2.9 ml de **tampón de parada**.
6. La cantidad de Umb liberada se mide ajustando la luz de excitación a 350 nm y a 440 nm la de emisión.

Para realizar la recta patrón, se llevan paralelamente muestras con cantidades de Umb entre 0 y 1500 pmoles, en las mismas soluciones que las muestras de plantas. La actividad quitinasa se expresa en pmol de Umb liberados por minuto y por μ g de proteína.

Solución de [4-MU- (GINAc)₄]: 250 μ M de [4-MU- (GINAc)₄] en tampón citrato sódico 0.1 M, pH 3.0

Solución de parada: 0.5 M Glicina- NaOH, pH 10.4

17.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD PEROXIDASA

La actividad peroxidasa constituye uno de los parámetros medidos en el análisis funcional de las plantas de tabaco transgénicas, descrito en el Capítulo 2 del presente trabajo.

La mezcla de reacción contiene 6 mM de guayacol y 6 mM de H₂O₂ en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4.5. La cinética de actividad se lleva a cabo a 30 °C frente al blanco y se refiere a mg de proteína total, definiéndose la unidad de actividad enzimática (U) como el incremento de una unidad de absorbancia a 470 nm por min. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Con ayuda de un sacabocado se recorta 1 cm² de la zona necrótica, donde ha tenido lugar la respuesta hipersensible. El nivel basal de actividad de las plantas se determina en muestras de tejido foliar previo a la infección con el fitopatógeno. Las muestras se congelan en nitrógeno líquido.
2. Se añade tampón fosfato-Na 50 mM pH 6.0 en una relación 1:6 p/v.
3. Se tritura la muestra en el tampón con ayuda de un homogeneizador.
4. Se centrifuga durante 1 min a 13000 g.
5. Se pasa el sobrenadante a un tubo limpio y se determina la cantidad de proteína total mediante un ensayo Bradford.
6. La actividad peroxidasa se mide como la variación de la OD a 470 nm durante 10 min. La **mezcla de reacción** (volumen final 500 µl) contiene: 485 µl tampón acetato-Na 50 mM pH 4.5, 6 mM de guayacol, 6 mM de H₂O₂ y 0.5-1 µg de proteína total. La muestra utilizada como blanco contiene los mismos componentes excepto proteína.
7. Se mide la absorbancia en intervalos de 2 min.

17.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD GLUCOAMILASA

Los ensayos de actividad glucoamilasa se basan en el método descrito por Barton *et al.* (1969). La glucosa liberada a partir del sustrato utilizado (almidón) se cuantifica con ayuda del producto Glucose Trinder (Sigma Diagnostics®), cuyo principio es el siguiente: sobre la glucosa liberada actúa la enzima glucosa oxidasa, que libera ácido glucónico y peróxido de hidrógeno; el cual, en presencia de la enzima peroxidasa y de los productos 4-aminoantipirina y p-hidroxibenceno sulfonato, genera agua y el colorante quinoneimina. La intensidad colorimétrica es, por tanto, proporcional a la cantidad de glucosa presente en la reacción. La cuantificación de la actividad se determina midiendo la absorbancia a 505 nm y refiriéndola a un patrón de glucosa realizado en paralelo. Como unidad enzimática (U) se considera la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de azúcar reductor por minuto. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Se preparan diluciones, en un volumen final de 200 µl, de la muestra que se desea analizar. Se toman medidas a distintos tiempos, por lo que se preparan tantas mezclas de reacción como puntos a determinar (0, 15, 30, 45 y 60 min).
2. Se añaden 200 µl de almidón parcialmente hidrolizado al 4% (p/v) en tampón acetato sódico 0.1 M pH 5.0.
3. Se incuba la muestra a 30 °C. La reacción se para incubando a 95 °C durante 5 min. La muestra se mantiene finalmente en hielo.
4. En un tubo se mezclan 1 ml del reactivo Glucosa Trinder y 5 µl de muestra.
5. Se mide la absorbancia a 505 nm y se refiere a cantidad de glucosa liberada según el patrón realizado.

17.6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA

La determinación de actividad luciferasa se llevó a cabo en el tampón PLB (Passive Lysis Buffer) y el reactivo LAR II (Luciferase Assay Reagent II), incluidos en el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). En esta reacción la luciferasa producida, en presencia de ATP, de iones Mg^{2+} y de oxígeno, actúa sobre el sustrato luciferina oxidándolo. La reacción de oxidación genera oxiluciferina como producto, a la vez que una emisión de luz que decae rápidamente. Dicha emisión se cuantifica durante 12 segundos con ayuda de un luminómetro Turner Designs TD-20/20 (DL Ready, USA).

La muestra (1 μ g de proteína), obtenida como se detalla en el apartado 13.1.1.2, se lleva hasta un volumen final de 20 μ l en tampón PLB. Inmediatamente antes de medir se le añaden 40 μ l de LAR II. El proceso se realiza a temperatura ambiente. Las unidades de luminiscencia son referidas a μ g de proteína.

18. ENSAYOS DE FLUORESCENCIA

Para el estudio de la fluorescencia en los transformantes de *Trichoderma* portadores de GFP, los cultivos se realizan sobre celofán principalmente, aunque también se analizan muestras procedentes de cultivo líquido. Se estudia el efecto producido por diferentes fuentes de carbono sobre la inducción génica, así como la expresión del gen marcador en ensayos de confrontación frente a hongos fitopatógenos. *T. harzianum* carece de autofluorescencia, por lo que no interfiere con la generada por la GFP.

Los cultivos en líquido se realizan en placas microtiter de 96 pocillos (Costar). En cada pocillo se inoculan 200 μ l de medio con el número adecuado de esporas (apartado 2.3.2). Las placas se incuban a 28-30 °C en oscuridad durante 4 días. La muestra se examina, recogiendo con unas pinzas parte del micelio formado en cada pocillo y observándola al microscopio.

Las muestras de cultivos sobre celofán se procesan cortando una porción del borde del halo de crecimiento del hongo, donde no existe un micelio tupido y pueden hallarse hifas separadas. En los ensayos de confrontación, la porción de celofán con micelio se toma del extremo opuesto al de contacto con el hongo fitopatógeno. Con ayuda de unas pinzas se retira de la placa el celofán y se coloca sobre unas gotas de agua dispuestas sobre un portaobjetos, con el micelio orientado hacia éstas. El hongo se desprende fácilmente y el celofán se retira sin problema. Se procede a observar la muestra en el microscopio. La detección de fluorescencia se realiza en un microscopio óptico (Leica, Solms, Alemania), con filtros específicos para excitación entre 450-490 nm y emisión entre 515-560 nm. Las fotografías digitales se toman con una cámara Sony DXC/950P.

19. PURIFICACIÓN DE PAREDES CELULARES DE HONGOS FILAMENTOSOS

En determinados experimentos de inducción génica se utilizan preparaciones de paredes celulares de *B. cinerea*. Se obtienen según se detalla a continuación:

1. Se cultivan 10^7 esporas/ml de *B. cinerea* en medio PDB (Difco), durante 4 días en agitación (200 rpm) a 25 °C.

2. Se autoclava el cultivo posteriormente.
3. Se recoge el micelio centrifugando a 8000 g durante 10 min a 4 °C.
4. Se lava con agua desionizada 3 veces, utilizando una espátula para resuspender la muestra.
5. Se centrifuga de nuevo a 4 °C.
6. El micelio se pasa a un mortero y se pulveriza en presencia de nitrógeno líquido.
7. La muestra se lava 3 veces con NaCl al 2% (p/v). Se centrifuga de nuevo en frío para recoger el micelio.
8. Se lava con agua desionizada y se centrifuga a 4 °C.
9. Se resuspende en agua y se sonica a 40 W, manteniendo el tubo en hielo, durante tres ciclos de 3-2-3 min.
10. La muestra se lava con agua desionizada y se centrifuga en rotor basculante durante 10 min a 4000 g en frío.
11. Se incuba a 60 °C durante 10 min.
12. Las etapas 10 y 11 se repiten tres veces
13. La muestra se recoge por centrifugación y se liofiliza.

20. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PLANTAS DE TABACO

Para el análisis funcional de las diferentes líneas transgénicas frente a bacterias fitopatógenas se utiliza la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 153, que provoca la respuesta hipersensible en la planta. La evaluación de los daños se realiza a 0, 24 y 48 h.

Las diferentes líneas se cultivan hasta alcanzar una altura de 35-40 cm, como se describe en el apartado 2.4.2. Las hojas tratadas de las distintas plantas se escogen de la misma edad o igual altura y se etiquetan a nivel del pecíolo en sentido ascendente, de forma que la de mayor altura corresponde al último punto tomado en el análisis (48 h).

La hoja de tabaco se inocula en seis puntos, dispuestos simétricamente con respecto al nervio central. Se utilizan dos diluciones del patógeno: 10^6 y 10^8 cfu/ml; como control se inocula la solución (10 mM de $MgSO_4$) donde se prepara la suspensión bacteriana. Las zonas inoculadas de un lado de la hoja son procesadas para medir la permanencia del patógeno en la planta; las del otro lado, para medir la actividad peroxidasa (descrita previamente en el apartado 17.4). El extremo de la hoja se procesa para el estudio de la expresión de las proteínas de respuesta a patógeno (proteínas PR) a nivel de mRNA.

Antes de la infección, se toma material vegetal para medir los niveles basales de peroxidasa y proteínas PR, así como la posible existencia de algún microorganismo ajeno al patógeno que se inocula.

Paralelamente a la toma de muestras, se analiza el desarrollo del área necrótica característica de la respuesta hipersensible, descrita en el Capítulo 2 de esta tesis. A continuación se describen los distintos procedimientos utilizados en el análisis funcional de las plantas.

20.1. INFECCIÓN CON *P.syringae* pv *tabaci*

La cepa patógena se refresca en medio TSA a 28 °C. Una vez obtenidas colonias diferenciadas, se procede a cultivar el microorganismo a mayor escala, con el fin de obtener biomasa suficiente para realizar la infección. Se puede utilizar cualquier otro medio nutritivo.

20.1.1. Preparación del inóculo

1. Se inocula una colonia en medio TSA (Oxoid LTD, England) y se incuba con agitación (250 rpm), durante la noche a 28 °C.
2. Se diluye el preinóculo 10 veces en el mismo medio y se incuba de igual forma.
3. Se recogen las células centrifugando durante 10 min, a 6000 g y a 4 °C.
4. Se resuspenden en 10 mM de MgSO₄ en frío, de manera que la OD₆₄₀ del cultivo sea 1 (equivale a una concentración aproximada de 10⁸ cfu/ml). Se prepara una dilución adicional de 10⁶ cfu/ml.

Medio TSA: Caldo de triptona-soja. Se añaden 30 g del preparado comercial por litro. Si el medio es sólido, se añaden 15 g/l de agar.

20.1.2. Inoculación

Como se ha descrito previamente, en cada lado de la hoja se inyectan las dos soluciones bacterianas y un inóculo de 10 mM de MgSO₄, como control. Se realizan tres repeticiones y se utilizan 4 plantas de cada línea para cada ensayo. Se plantea previamente la localización de los puntos de inoculación, donde el líquido quedará confinado por los vasos conductores del tejido. El protocolo se detalla a continuación:

1. Se hace un agujero limpio con ayuda de una aguja gruesa aproximadamente en el centro de cada zona de inoculación.
2. Se carga una jeringa hipodérmica de tipo insulina (sin aguja) con solución bacteriana.
3. Se coloca el dedo índice taponando el agujero por el haz de la hoja al mismo tiempo que se coloca la jeringa por el envés, de manera que el perímetro de la jeringa incluya el orificio hecho con anterioridad.
4. Se presiona ligeramente, para que la hoja no se rompa y se baja el émbolo con suavidad para permitir la entrada de la suspensión bacteriana en el tejido. Se inoculan 50 µl por punto.
5. Se mantienen las plantas en la cámara de cultivo y se evalúan los daños en las zonas de infección cada 24 h.

20.2. PERMANENCIA DEL PATÓGENO EN LA PLANTA

Para analizar el crecimiento bacteriano *in planta*, se cortan discos de hoja de 1 cm², de las zonas infiltradas a diferentes tiempos, se les añaden 500 µl de una solución 10 mM de MgCl₂ y se trituran con ayuda de un homogeneizador. La población bacteriana (cfu/ml) se determina sembrando en placas de medio nutritivo TSA, distintas diluciones del homogenizado. Del mismo modo y justo antes de inocular el patógeno, se toman muestras de cada planta y se analiza la existencia de cepas bacterianas previas a la infección.

20.3. ENSAYO DE RESISTENCIA DE PLÁNTULAS DE TABACO *in vitro*

20.3.1. Ensayo de resistencia a *R. solani*

El hongo *R. solani* infecta las raíces de plantas de la familia *Solanaceae*, produciendo la enfermedad denominada podredumbre del cuello de la raíz.

En este trabajo se efectúan ensayos frente a este hongo con el objetivo de determinar el grado de resistencia que presentan las líneas transgénicas frente a las control. Se utilizan germínulas de tabaco de 10-20 días de edad, de tamaño similar (0.5-1 cm de longitud de la parte aérea) e igual estado de desarrollo.

20.3.1.1. Preparación de cajas con *R. solani*

1. El hongo fitopatógeno se propaga en medio sólido PDA a 25 °C. Estos inóculos se aislan regularmente de tejido vegetal infectado para mantener su virulencia.
2. Se cultiva el hongo en medio PDB, manteniéndolo durante 4-5 días a 25 °C con fuerte agitación.
3. Se recoge el micelio por filtración, se lava con agua estéril y se pesa.
4. Se mezcla el hongo con agua hasta una concentración final del 0.75 g/l y se homogeneiza batiendo la muestra a máxima potencia, hasta que adquiera un aspecto uniforme.
5. Al micelio triturado se añade agar al 5% (p/v) a 60 °C hasta una concentración final del 0.7 %.
6. La mezcla resultante se dispensa en cajas de Petri, que se mantienen a temperatura ambiente hasta que solidifiquen. Se pueden almacenar a 4 °C hasta una semana.

20.3.1.2. Infección

1. Se siembran semillas de plantas sin transformar y transgénicas en medio MS, como se especifica en el apartado 2.4. Se cultivan durante 10-20 días.
2. Las plántulas seleccionadas para el ensayo se recogen cuidadosamente, para no dañar el tejido, con unas pinzas estériles procurando que no queden restos de MS en las raíces.
3. Posteriormente se transplantan a cajas con agar-*Rhizoctonia*, sumergiendo con sumo cuidado las raíces en el medio, para favorecer de este modo la infección por el fitopatógeno.
4. Se incuban las placas en la cámara de cultivo correspondiente y se evalúan los daños a partir del séptimo día tras la infección. El daño en la plántula se manifiesta por la maceración del tejido vegetal, por su necrosis y la posterior muerte de la germínula.
5. Los resultados de las evaluaciones se representan como porcentajes de supervivencia de las plantas.

20.3.2. Ensayo de resistencia a estrés abiótico

El procedimiento es similar al descrito anteriormente, ya que las plántulas se preparan del mismo modo y se toman de la misma edad para efectuar el ensayo.

En este estudio se analiza la resistencia de las plantas frente a estrés de tipo hídrico, salino y por metales pesados. De cada una de las líneas se toman 60 germínulas, que se transplantan a las distintas placas y se incuban en la cámara de cultivo; haciendo un

seguimiento del daño generado. La evaluación del porcentaje de supervivencia se realiza tras una semana de incubación.

Las placas de medio se preparan con agar-agua desionizada, adicionando el agente tóxico en la siguiente medida:

★ Estrés salino: 250 mM de NaCl. Se añaden 15 g/l antes de autoclavar.

★ Estrés por metales pesados: 300 μ M de CdSO₄·8 H₂O.

300 μ M de CuSO₄·5 H₂O.

Se prepara una solución concentrada de los metales y se esteriliza por filtración. Se añaden al agar-agua tras autoclavar el medio.

★Estrés osmótico: 500 y 800 mM de sorbitol. Se disuelve el sorbitol en agua desionizada, se añade el agar y se esteriliza posteriormente por autoclave.

21. DIFFERENTIAL DISPLAY

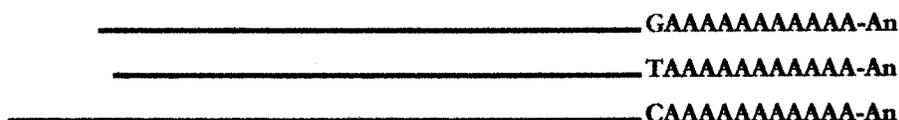
La técnica *Differential Display*, descrita por Liang & Pardee (1997), se utiliza con el fin de clonar genes que se expresan de forma diferencial bajo diferentes condiciones de cultivo.

Básicamente consiste en la resolución en un gel de acrilamida del producto procedente de la amplificación por PCR de mRNAs retrotranscritos, obtenidos a partir de cultivos crecidos en diferentes condiciones.

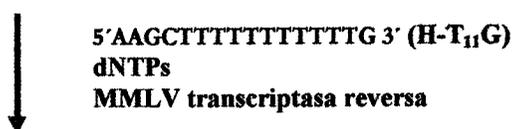
Así pues, tras exponer al microorganismo a diferentes condiciones, el mRNA sintetizado bajo éstas constituye el molde para la formación de cDNA. Posteriormente, se efectúa un paso de amplificación por PCR, donde se incorpora un isótopo radiactivo, utilizando por una parte un cebador homólogo a la zona de poliadenilación y, por otra, un cebador de secuencia aleatoria. El producto, se resuelve en un gel de poliacrilamida y se expone a una película. Las bandas presentes en la autorradiografía, corresponden a aquellos genes que se expresan en ese momento. A partir del gel, se purifican aquellas que posean el patrón de expresión diferencial que se adecúe al objetivo de nuestro estudio. El fragmento de DNA purificado se utiliza como sonda en el aislamiento de clones completos de genotecas.

Se muestra un esquema del proceso:

1. Población de mRNAs purificados a partir del organismo tras estar expuesto a una determinada condición:



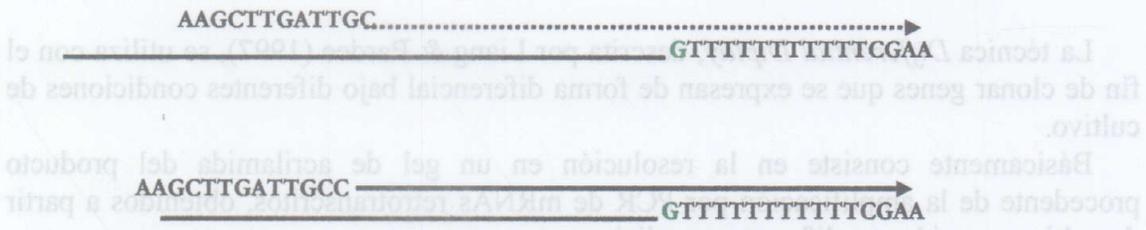
2. Transcripción reversa:



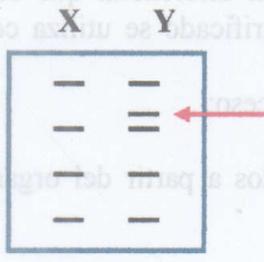
CAAAAAAAAAAAAA-An
 GTTTTTTTTTTTTCGAA

3. Amplificación por PCR:

5'AAGCTTGATTGCC 3'(Cebador H-AP-1)
 5'AAGCTTTTTTTTTTTTGG 3'(H-T₁₁G)
 dNTPs
 α -[³³P-dCTP]
 Polimerasa de DNA AmpliTaq



4. Gel desnaturalizante:



Para el desarrollo de esta técnica se utiliza el kit RNAimage (GeneHunter Corporation). El método completo se describe de forma detallada en los siguientes apartados:

21.1. TRATAMIENTO DEL RNA TOTAL CON DNAsaI

Es conveniente el uso de RNA total en lugar del poliadenilado. Se sigue el protocolo descrito en el apartado 5 de *Materiales y Métodos*, utilizando en todo momento material tratado con DEPC. Una vez obtenido el RNA, se eliminan las posibles trazas de DNA genómico que pueda contener la muestra, de la siguiente forma:

1. Se incuban de 10 a 100 μg de RNA total con 10 U de DNAsa I (libre de RNAsa) en **tampón de DNAsa I** durante 30 min a 37 °C.
2. Se inactiva la enzima añadiendo un volumen de fenol:cloroformo (3:1). Se agita vigorosamente y se incuba en hielo durante 10 min.
3. Se centrifuga a 13000 g durante 5 min a 4 °C.
4. A la fase acuosa se le añaden 3 volúmenes de etanol en presencia de 0.3 M de acetato sódico. Se incuba a -80 °C durante 30 min.
5. Se centrifuga a 13000 g durante 10 min a 4 °C.
6. Se lava el precipitado con 500 μl de etanol al 70%.
7. Se centrifuga a 13000 g durante 5 min.
8. Se seca el precipitado y se resuspende en 20 μl de agua-DEPC.
9. El RNA se cuantifica por espectrofotometría. La calidad de la muestra se analiza en un gel de agarosa con formaldehído al 7%.
10. El RNA se almacena a -80 °C, a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Tampón de DNAsa I: 10 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM de KCl y 1.5 mM de MgCl_2 .

21.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA DEL mRNA

1. Para cada muestra de RNA se llevan a cabo tres procesos de retrotranscripción, cada uno con un cebador **oligo-dT** distinto (**H-T₁₁N set**, Gene Hunter). Para ello, se mezclan en un tubo hasta un volumen final de 20 μl : 9.4 μl de agua desionizada, 4 μl de **tampón RT 5x**, 1.6 μl de dNTP 250 μM , 2 μl de RNA total (libre de DNA y a una concentración final de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en agua-DEPC), y 2 μl de oligo-dT (AAGCT₁₁M 2 μM , donde M es G, A o C).
2. Se incuba a 65 °C durante 5 min y posteriormente a 37 °C durante 10 min.
3. Se añade 1 μl de MMLV transcriptasa reversa Superscript[®] II (Gibco BRL) a cada tubo.
4. Se incuba a 37 °C durante 50 min. La reacción se para incubando a 75 °C durante 5 min.
5. Se almacena a -80 °C hasta su uso.

Tampón RT 5x: 125 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 188 mM de KCl; 7.5 mM de MgCl_2 y 25 mM de DTT.

21.3. AMPLIFICACIÓN POR PCR

A partir de una muestra inicial de RNA, se realizan 24 reacciones de amplificación diferentes, ya que se combinan 8 cebadores aleatorios distintos (H-AP primer) con tres oligo-dT (AAGCT₁₁M). Se procede de la siguiente forma:

1. Se preparan las reacciones de PCR en un volumen final de 20 μl de la siguiente manera: 10 μl de agua desionizada, 2 μl de tampón de PCR 10x, 1.6 μl de dNTPs 25 μM , 2 μl de cebador de secuencia aleatoria 2 μM (**H-AP primer set**, GeneHunter), 2 μl de AAGCT₁₁M 2 μM , 2 μl de la reacción de retrotranscripción anterior, 0.2 μl de α -[³³P]-dATP y 2 U de Taq polimerasa (AmpliTaq[®], Perkin-Elmer).

2. Se procede a la amplificación de la siguiente forma: 94 °C durante 30 segundos; 40 ciclos a 40 °C durante 2 min y 72 °C durante 30 segundos; finalmente 72 °C durante 5 min.

21.4. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%

1. Se prepara el gel desnaturalizante al 6 % de poliacrilamida (**PAGE 6%**) en tampón TBE.
2. Se deja polimerizar al menos durante 2 h. Se lavan los pocillos abundantemente para eliminar cualquier posible resto de urea.
3. Se precorre el gel durante 30 min.
4. Se mezclan 3.5 µl de cada muestra con 2 µl de tampón de carga y se incuban a 80 °C durante 2 min antes de cargarlas en el gel.
5. La electroforesis se realiza a 60 W durante 3.5 h (se mantiene constante la corriente, el voltaje no debe exceder los 1700 V), hasta que el colorante alcance el final del gel. Se coloca el gel sobre un papel 3MM, se cubre con una película adherente y se seca a 80 °C durante 1 h. El gel no se fija con metanol/ácido acético.
6. Se expone a una película autorradiográfica durante toda la noche.

PAGE 6%: Se mezclan 32 ml de **solución A** y 68 ml de **solución B**. Se añaden 6.4 ml de TBE 10x, se desgasifica con ayuda de un quitasato, tras filtrar a través de una membrana de 0.2 µm de poro y, finalmente, se añaden 370 µl de APS [10% (p/v) de persulfato amónico] y 90 µl de TEMED.

Solución A: Acrilamida-N, N'-metilenbisacrilamida al 20 % (p/v) y urea al 45 % (p/v). Se disuelven 137.25 g de urea en 150 ml de agua desionizada calentando. Se deja enfriar antes de añadir 57.95 g de acrilamida y 3.05 g de N, N'-metilenbisacrilamida. Se agita durante 1 h y se enrasa el volumen hasta 300 ml.

Solución B: Urea al 45 % (p/v). Se disuelven 225 g de urea en 300 ml de agua desionizada. Se agita durante 1 h y se enrasa el volumen hasta 500 ml.

21.5. REAMPLIFICACIÓN DEL cDNA

1. Tras revelar la película expuesta, se localizan las bandas de interés.
2. Se orienta la autoradiografía con respecto al gel y se corta la banda de interés.
3. Se sumerge la porción de 3MM en 100 µl de agua desionizada durante 10 min.
4. Se hierva la muestra, tras sellar el tubo con parafilm, durante 15 min.
5. Se centrifuga a máxima velocidad durante 2 min para recoger los restos de papel y de gel. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo.
6. Se añaden 10 µl de acetato sódico 3 M pH 5.2, 5 µl de glucógeno (10 mg/ml) y 450 µl de etanol absoluto.
7. Se incuba la muestra durante 30 min en hielo seco o a -80 °C. Se centrifuga a máxima velocidad durante 10 min a 4 °C.
8. Se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado con 200 µl de etanol al 85% frío (un porcentaje menor nos hará perder la muestra).
9. Se eliminan los posibles restos de etanol y se disuelve el precipitado en 10 µl de agua desionizada. Se utilizan 4 µl para la reamplificación y el resto se almacena a -20 °C.

10. La reamplificación se lleva a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, exceptuando la concentración de dNTPs, que es 20 μM (se usa un stock 250 μM) en vez de 2-4 μM , y que no se usan isótopos en este caso. Se recomienda un volumen final de reacción de 40 μl . Por cada reacción se mezclan: 20.4 μl de agua desionizada, 4 μl de tampón de PCR 10x, 3.2 μl de dNTPs (250 μM), 4 μl del cebador arbitrario correspondiente (2 μM), 4 μl del oligo-dT correspondiente (2 μM), 4 μl de la muestra de cDNA obtenida en el apartado anterior y 0.4 μl de AmpliTaq (5 U/ μl).
11. Tras finalizar la PCR, se resuelven 30 μl de la muestra en un gel de agarosa al 1.5 % (p/v) con bromuro de etidio. Se almacena el resto de la muestra a -20 °C.
12. Se comprueba si el tamaño de la banda en el gel de agarosa se corresponde con el observado en el gel de acrilamida.

21.6. CONFIRMACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN

1. Se extrae la banda de DNA del gel de agarosa como se describe en el apartado 3.3 de *Materiales y Métodos*, se subclona en pGEM-T[®] (Promega) y se transforma la cepa de *E.coli* correspondiente (apartados 3.8 y 12.1, respectivamente).
2. Se determinan, mediante **northern reverso** (apartado 21.6.1), los clones que contienen el inserto que se expresa diferencialmente.
3. Una vez seleccionados, se purifica el inserto a partir de los que hayan resultado positivos y se confirma el patrón de expresión del gen por northern blot, como se detalla en el apartado 10.
4. Se procede a la obtención del clon completo. Para ello, en este trabajo se escruta una genoteca de cDNA utilizando como sonda el inserto amplificado (Apartado 11.2 de *Materiales y Métodos*).

21.6.1. Northern reverso.

Con este método, se descartan los clones falsos positivos obtenidos en el subclonaje, procedentes de bandas que comigran con la de interés. De este modo, se evita el análisis por northern de cada uno de los insertos aislados.

En esta técnica son los mRNA de las diferentes condiciones, los que se marcan radiactivamente y los que se hibridan con filtros similares portadores de múltiples cDNAs. Así pues, con una sola hibridación, se determina los clones que portan el inserto correspondiente a la expresión diferencial. Este procedimiento presenta las ventajas de: (1) escrutar múltiples filtros que contengan fragmentos de cDNA con RNAs provenientes de cultivos diferentes; (2) eliminar falsos clones positivos; y (3) proceder directamente a secuenciar el DNA de los clones seleccionados.

Los cDNAs, en este caso, proceden de colonias crecidas sobre filtro. El protocolo seguido es el de Grünstein & Hogness (Sambrook *et al.*, 1989), especificado en el apartado 9.1.5. Las colonias, que proceden de las ligaciones que se efectuaron con los insertos amplificados, se pican sobre un filtro de nylon, realizando una réplica en paralelo. Una vez crecidas se procesan para obtener el DNA y éste se fija covalentemente a la membrana.

Para realizar el marcaje de RNAs se procede como se detalla a continuación:

1. Las reacciones de marcajese realizan en un volumen final de 50 µl conteniendo: 10 µl de tampón RT 5x, 5 µl de oligo-dT 10 µM, 8 µl de dNTPs(-C) 500 µM, 5 µl de α-[³³P]-dCTP, 10 µg de RNA total y agua hasta 45 µl.
2. Se incuba a 65 °C durante 5 min y a continuación 10 min a 37 °C.
3. Se añaden 5 µl de transcriptasa reversa MMVL y se incuba durante 50 min a 37 °C.
4. Se purifica la sonda como se describe en el apartado 9.2.

Tampón RT 5x: Ver apartado 21.2.

Los lavados de los filtros en el northern reverse se realizan en condiciones más suaves. En primer lugar se lava la membrana dos veces durante 15 min a TA, en solución SSC 1x y 0.1% de SDS. A continuación se lava durante 15 min en SSC 0.25x y 0.1% de SDS. Tras los lavados, los filtros se exponen a una película autorradiográfica, como se especifica en el apartado 9.2 de *Materiales y Métodos*.

22. CONSTRUCCIÓN DE LA GENOTECA DE cDNA EN LAMBDA-ZAP

En este trabajo la genoteca se construye en el vector **Uni-ZAP XR** (Stratagene), donde el cDNA se clona de forma dirigida en las dianas *EcoRI/XhoI*, quedando orientados su extremo 5' y la zona de poliadenilación en ese sentido, respectivamente. Este sistema permite la clonación de fragmentos de hasta 10 kb, la realización de escrutinios con anticuerpos o con sondas de DNA y, por otra parte, permite la obtención del fagémido pBluescript por escisión in vivo (apartado 11.2). El mapa del vector Uni-ZAP XR se muestra a continuación:

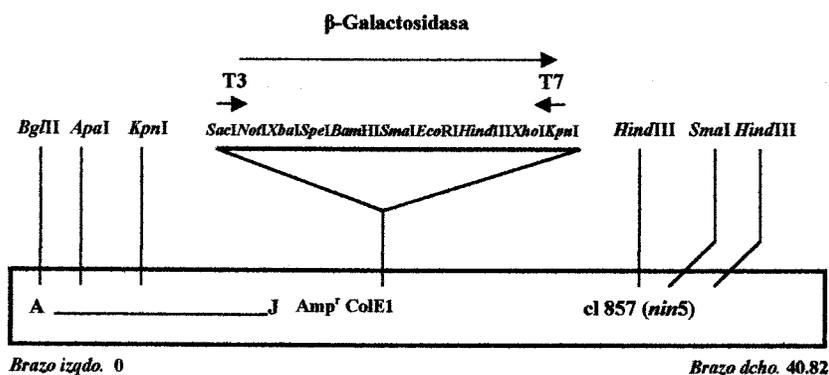


Figura 3. Esquema del vector Uni-ZAP XR

Se sigue el procedimiento recomendado por la casa comercial, que se resume a continuación:

En primer lugar se efectúa la retrotranscripción del mRNA, utilizando un cebador oligo-dT (portador de la diana *XhoI*), en presencia de **5-metil dCTP**. Los grupos metilo que se incorporan en una de las cadenas del cDNA, lo protegen frente a

restricciones posteriores. Se usa además la cepa bacteriana XL1-Blue MRF', carente de los sistemas de restricción *mcrA* y *mcrB*, susceptibles de actuar sobre DNA hemimetilado.

Tras la retrotranscripción, se ligan los adaptadores, que portan la diana *EcoRI*; y se digiere con *XhoI*, para condicionar la orientación del cDNA. Posteriormente, las moléculas se separan por tamaño mediante cromatografía en columna de Sepharosa CL-2B. El primer pico eluido corresponde al cDNA; el segundo, a los nucleótidos que no han sido incorporados (el seguimiento se realiza marcando radiactivamente la muestra).

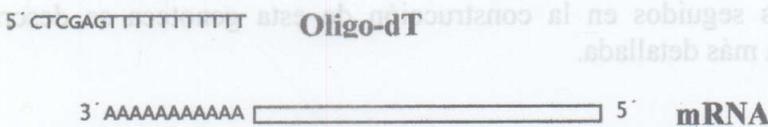
Para un tamaño de fraccionamiento estándar (> 400 pb), Stratagene recomienda recoger 12 fracciones del primer pico eluido, de las cuales se toman alícuotas, para chequear en un gel de acrilamida al 5 % en condiciones no desnaturizantes el tamaño del DNA de las sucesivas fracciones. Las muestras seleccionadas se cuantifican antes de ser subclonadas en el vector Uni-ZAP XR (Stratagene).

Los fagos recombinantes, que resultan de la ligación de los insertos con el vector, se empaquetan in vitro utilizando el extracto de empaquetamiento **Gigapack III Gold** (Stratagene). La eficiencia de empaquetamiento es de 10^6 a 10^7 fagos/ μ g de DNA. Posteriormente la genoteca se amplifica, se titula y se dispensa en alícuotas con DMSO al 7% (v/v), que pueden almacenarse a -80 °C.

En este trabajo, el RNA utilizado en la construcción de esta genoteca, proviene de cultivos de *T. harzianum* crecidos en las condiciones utilizadas en los experimentos de *Differential Display* (Capítulo 3), e incluye además la condición adicional de micelio crecido en quitina al 0.5% (p/v) durante 8 h.

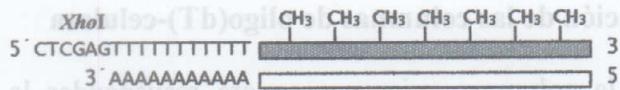
A continuación se esquematizan los pasos mencionados anteriormente:

1. Obtención del mRNA y retrotranscripción:

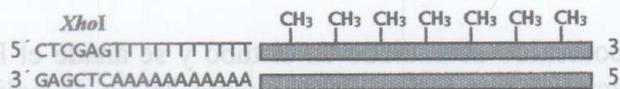


MMLV-RT
5-metil dCTP
dATP, dGTP, dTTP

2. Síntesis de la segunda cadena de cDNA:

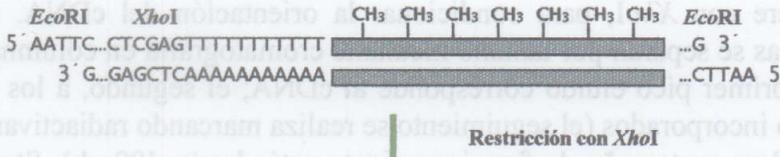
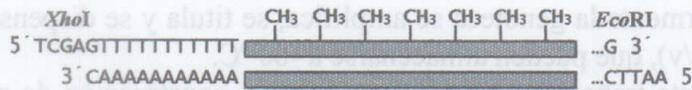


RNasa H
polimerasa I de DNA
dNTPs



Adaptadores con *EcoRI*
Ligasa T4 de DNA

3. Acoplamiento del adaptador:

4. Digestión con *XhoI* y obtención de cDNA dirigido:

5. Cromatografía en columna (fraccionamiento de la muestra). Chequeo en gel de poliacrilamida no desnaturizante.

6. Ligación al vector Uni-ZAP XR (Stratagene).

7. Empaquetamiento de los fagos. Titulación de la genoteca.

Los protocolos seguidos en la construcción de esta genoteca se describen a continuación de forma más detallada.

22.1. PURIFICACIÓN DE mRNA

La obtención del mRNA a partir de RNA total, se lleva a cabo con el producto comercial **mRNA Purification Kit** (Amersham Biosciences).

22.1.1. Preparación de las columnas de oligo(dT)-celulosa

1. Se invierte la columna varias veces para resuspender la matriz de oligo (dT)-celulosa.
2. Se elimina en primer lugar el tapón superior, para evitar la formación de burbujas de aire. Se introduce la columna en un tubo de 15 ml (Corex) y se deja salir el tampón almacenado por gravedad.
3. Se equilibra la columna con 2 ml de **High-salt buffer**, dejando que eluya por gravedad.
4. Se vacía el contenido acumulado en el tubo y se añade el RNA total. La columna tiene la capacidad de unir aproximadamente 25 μg de poli(A)+RNA. Asumiendo que el 2% del RNA total es poli(A)+, se aplican como máximo 1.25 mg de RNA total. La muestra de RNA total se diluye previamente en 1 ml de **Elution buffer** (tampón TE 1x pH 8.0).

22.1.2. Cromatografía en columna.

1. Se lleva la muestra a un volumen final de 1 ml, si fuera necesario, con ayuda de TE 1x pH 8.0. Se incuba la muestra a 65° C durante 5 min, se pasa a hielo y se le añaden 0.2 ml de **Sample buffer**.
2. Se aplica la muestra en la columna de oligo-dT celulosa, en la que difunde por gravedad. Se centrifuga a 1500 rpm durante 2 min.
3. Se añaden 0.25 ml de **High-salt buffer** a la columna y se centrifuga a 1500 rpm durante 2 min. Se repite de nuevo con 0.25 ml del mismo tampón.
4. Se lava la columna 3 veces con alícuotas de 0.25 ml de **Low-salt buffer**. Se centrifuga a 1500 rpm durante 2 min en cada lavado.
5. Se introduce un tubo estéril de microcentrifuga siliconizado en el interior del tubo de 15 ml. El mRNA unido a la columna se eluye lavando la columna 4 veces sucesivas con 0.25 ml de **Elution Buffer**, previamente calentado a 65 °C. se centrifuga a 1500 rpm durante 2 min tras cada aplicación. Los eluidos se recogen en el mismo tubo.
6. Se retira la columna y se saca el microtubo con ayuda de unas pinzas flameadas
7. El RNA se precipita en un tubo de 15 ml añadiendo 100 µl de **Sample buffer**, 10 µl de **Glycogen solution** y 2.5 ml EtOH absoluto frío. Se homogeniza la mezcla y se incuba a -20°C al menos 2 h. Posteriormente, se centrifuga a 4°C durante 10 min a 12000 g.

22.2. SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE cDNA

1. La mezcla de reacción, con un volumen final de 50 µl, contiene: 5 µl de tampón 10x **First-Strand**, 3 µl de la mezcla de nucleótidos (dATP, dGTP, dTTP y 5-metil dCTP), 2 µl del oligo-dT *XhoI* (1.4 µg/ µl), 1 µl de inhibidor de RNAsa (40 U/ µl) y 5 µg de mRNA en un volumen de 39 µl de agua-DEPC.
2. Se homogeniza e incuba a TA durante 10 min para el acoplamiento del cebador a la zona de poliadenilación.
3. Se añaden 1.5 µl de **MMLV-RT** (50 U/ µl) y se incuba a 37 °C durante 1 h.
4. La mezcla de reacción se mantiene en hielo

22.3. SÍNTESIS DE LA SEGUNDA CADENA DE cDNA

1. La mezcla de reacción, con un volumen final de 200 µl, contiene: 20 µl de tampón 10x **Second-Strand**, 6 µl de la mezcla de dNTPs (sin 5-metil dCTP), 2 µl de **RNAsa H** (1.5 U/ µl), 11 µl de **polimerasa I de DNA** (9.0 U/ µl), 114 µl de agua-DEPC y 47 µl de la muestra obtenida en el apartado 22.2.
2. Se homogeniza e incuba a 16 °C durante 2.5 h.
3. Para asegurar la formación de extremos romos, se añaden 23 µl de la mezcla de dNTPs y 2 µl de la polimerasa de DNA *Pfu* (Stratagene), y se incuba a 72 °C durante 30 min.
4. Se añaden 200 µl de fenol:cloroformo [1:1 (v/v)] y se agita vigorosamente.
5. Se centrifuga a máxima velocidad durante 2 min a TA.
6. Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo, se añade un volumen de cloroformo y se agita vigorosamente.
7. Se centrifuga a en una microcentrífuga máxima velocidad durante 2 min a TA.

8. El cDNA, contenido en la fase acuosa, se precipita añadiendo 20 μ l de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 400 μ l de etanol absoluto.
9. Se incuba durante toda la noche a -20 °C.
10. Se centrifuga a máxima velocidad durante 1 h a 4 °C.
11. El precipitado se lava con 500 μ l de etanol al 70 %.
12. Se centrifuga a máxima velocidad durante 2 min.
13. Una vez seco el precipitado, se resuspende en 9 μ l de la preparación que contiene los adaptadores *EcoRI* (0.4 μ g/ μ l).

22.4. LIGACIÓN DE LOS ADAPTADORES *EcoRI*

1. A 8 μ l de la suspensión obtenida en el apartado 22.3 se le añaden: 1 μ l de tampón de ligasa 10x, 1 μ l de ATP (10 mM) y 1 μ l de ligasa de DNA T4 (4 U/ μ l).
2. Se incuba durante la noche a 4 °C, o bien, durante 2 días a 4 °C.
3. La ligasa se inactiva incubando la muestra a 70 °C durante 30 min. Se deja enfriar la reacción a TA durante 5 min.
4. A continuación, se fosforilan los extremos *EcoRI* ligados al cDNA. Para ello se añaden a la muestra: 1 μ l de tampón de ligasa 10x, 2 μ l de ATP 10 mM, 6 μ l de agua estéril y 1 μ l de la enzima polinucleótido quinasa de T4 (10 U/ μ l).
5. Se incuba a 37 °C durante 30 min.
6. La quinasa se inactiva incubando la mezcla durante 30 min a 70 °C.
7. La muestra se enfría a TA durante 5 min.

22.5. DIGESTIÓN CON *XhoI*

1. A la mezcla de reacción del apartado 22.4 se le añaden: 28 μ l del tampón de la enzima 1x y 3 μ l de *XhoI* (40 U/ μ l).
2. Se incuba a 37 °C durante 1.5 h.
3. Se añaden 5 μ l de **tampón STE 10X** y 125 μ l de etanol absoluto a la mezcla de reacción.
4. Se incuba toda la noche a -20 °C.
5. Se centrifuga a máxima velocidad a 4 °C durante 1 h.
6. El precipitado se resuspende en 14 μ l de tampón STE 1x.
7. Se añaden 3.5 μ l de colorante de carga de cromatografía.

Tampón STE 10x: 1 M de NaCl, 200 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 100 mM de EDTA.

22.6. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA

1. Para la cromatografía se acopla una jeringa de 10 ml, sin el émbolo, a una pipeta de 1 ml que porta en su extremo inferior, una porción de filtro de algodón para retener la resina Sefarosa CL-2B.
2. Se pasan por la columna 2 ml de tampón STE 1X y a continuación, una vez homogeneizada la suspensión de resina, se rellena la columna.
3. Se lava la columna con 10 ml de tampón STE 1x. A continuación, evitando que se seque la resina, se añade la muestra de cDNA.

4. Una vez que la muestra entre en la resina, se añaden 3 ml de tampón, depositándolos sobre la pared de la jeringa para evitar cualquier agitación brusca.
5. La migración de la muestra se detecta mediante la difusión del colorante en la resina. Se recogen progresivamente distintas fracciones del eluido (3 gotas por fracción ~100 μ l).
6. Se analizan 8 μ l de cada alícuota en un gel de poliacrilamida (PAGE) no desnaturizante al 5 %, para determinar la correcta separación y seleccionar las fracciones de interés.

PAGE 5 % no desnaturizante: Se mezclan 10 ml de tampón TBE 5x, 8.33 ml de una solución de acrilamida-bisacrilamida (29:1) y 31.67 ml de agua desionizada estéril. Se desgasifica y se añaden 25 μ l de TEMED y 250 μ l de APS al 10 % (p/v).

TBE 5x: 10 mM de EDTA y 0.45 M de Tris-Borato pH 8.0.

22.7. PROCESAMIENTO DE LAS FRACCIONES DE cDNA

1. Las fracciones seleccionadas se mezclan con un volumen de fenol:cloroformo [1:1 (v/v)] para eliminar las proteínas que han sido arrastradas con la muestra.
2. Se agita vigorosamente y se centrifuga a máxima velocidad durante 2 min a TA.
3. A la fase acuosa se le añade un volumen de cloroformo. Se agita vigorosamente y se centrifuga 2 min a TA a máxima velocidad.
4. El cDNA, contenido en la fase acuosa, se precipita añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto e incubando toda la noche a -20 °C. El tampón STE 1x contiene suficiente NaCl para favorecer la precipitación.
5. Se centrifuga la muestra a máxima velocidad durante 1 h a 4 °C.
6. El precipitado se lava con 200 μ l de etanol absoluto, pero sin agitar la muestra. Se elimina el etanol totalmente, pero sin dejar que el precipitado se seque en exceso. Se resuspende en 5 μ l de agua estéril, se cuantifica y se almacena a -20 °C hasta su uso. Stratagene recomienda ligar 100 ng de cDNA a 1 μ g de vector.

22.8. LIGACIÓN DEL cDNA AL VECTOR Uni-ZAP XR

1. En un microtubo se mezclan: 100 ng de cDNA en un volumen final de 2.5 μ l, 0.5 μ l de tampón de ligasa 10x, 0.5 μ l de ATP 10 mM (pH 7.5), 1 μ l de vector Uni-ZAP XR (1 μ g/ μ l) y 0.5 μ l de ligasa T4 de DNA (4 U/ μ l).
2. Se incuba la reacción toda la noche a 12 °C, o bien, durante 2 días a 4 °C.
3. Se utiliza 1 μ l de la muestra para el proceso de empaquetamiento. Un tamaño representativo en una librería primaria es de aproximadamente $\sim 1.10^6$ clones. Si el título resultara menor, se utilizan 2-3 μ l de la muestra para la ligación.

22.9. EMPAQUETAMIENTO

Se utiliza el extracto Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene). Procedemos de la siguiente forma:

1. Se transfiere el extracto de empaquetamiento, almacenado a -80 °C, a hielo seco.

2. Se le añaden 1-4 μl del DNA ligado previamente (0.1-1.0 μg). Se mezcla bien con ayuda de la pipeta evitando la formación de burbujas.
3. Se incuba a TA (22 $^{\circ}\text{C}$) durante 2 h. Tiempos mayores afectan negativamente a la eficiencia de empaquetamiento.
4. Se añaden 500 μl de tampón SM.
5. Se añaden 20 μl de cloroformo y se agita vigorosamente.
6. Se centrifuga brevemente para sedimentar los restos.
7. El sobrenadante, que contiene la genoteca, se almacena a 4 $^{\circ}\text{C}$.

22.10. TITULACIÓN DE LA GENOTECA

1. Se refresca la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' en LB sólido con tetraciclina (apartado 11.2).
2. Se inocula una colonia en 3 ml de LB suplementado con 0.2 % de maltosa (p/v) y 10 mM de MgSO_4 . Se deja crecer durante la noche a 30 $^{\circ}\text{C}$ con agitación (200 rpm).
3. El preinóculo se diluye 1:10 en 50 ml del mismo medio. Se incuba durante la noche a 30 $^{\circ}\text{C}$, o bien de 4-6 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. El cultivo no debe sobrepasar de $\text{OD}_{600} = 1.0$.
4. Se centrifuga el cultivo durante 10 min a 500 g.
5. Las células se resuspenden en 10 mM de MgSO_4 estéril hasta $\text{OD}_{600} = 0.5$.
6. Se añade 1 μl de la solución de fagos de la genoteca a 200 μl de bacterias hospedadoras.
7. Se incuba durante 15 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ para favorecer la infección.
8. A la mezcla se le añaden: 2-3 ml de agar de cobertera fundido y atemperado a ~ 48 $^{\circ}\text{C}$, 15 μl de IPTG 0.5 M (en agua) y 50 μl de X-gal [250 mg/ml (en DMF)].
9. Se vierte la mezcla sobre una placa de medio LB con 10 mM de MgSO_4 y se deja solidificar durante 10 min. Se invierten las cajas y se incuban durante la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$.
10. Los halos de lisis se detectan a las 6-8 h. Transcurridas 8 h de incubación, se detecta color. El número de halos azules debería ser menor de $1 \cdot 10^5$ pfu/ μg de vector; mientras que el de los fagos recombinantes (halos blancos) debería superar al fondo en 1 ó 2 órdenes de magnitud.

Nota: Las genotecas primarias suelen ser inestables, por lo que se amplifican de inmediato.

22.11. AMPLIFICACIÓN DE LA GENOTECA EN Uni-ZAP XR

Este paso es necesario para garantizar la mayor representatividad de clones en la genoteca. Sin embargo, no se recomienda la realización de más de una ronda de amplificación, ya que los clones menos representados, estarían aún más diluidos. Se procede de la siguiente manera:

1. Se prepara la bacteria hospedadora como se menciona en el apartado 22.10. Se diluye en 10 mM de MgSO_4 hasta $\text{OD}_{600} = 0.5$. Se utilizan 600-800 μl de bacterias por cada placa de 150 mm.
2. Se mezclan alícuotas de la genoteca, conteniendo $\sim 5 \cdot 10^4$ pfu con 600 μl de bacterias. El volumen de las alícuotas no debe ser mayor de 300 μl .
3. Se incuba a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Resultados I

4. Se añaden 6.5 ml de agar de cobertera atemperado a 48 °C a cada alícuota. Se homogeniza y se vierte sobre la placa de medio LB con 10 mM de MgSO₄.
5. Se incuba a 37 °C durante 6-8 h hasta confluencia.
6. Se cubren las placas con 8-10 ml de SM cada una. Se incuban con agitación suave durante toda la noche a 4 °C.
7. Se recoge el eluido de las placas y se reparte en 2 tubos de polipropileno. Se lavan las placas con 2 ml adicionales de tampón SM.
8. Se añade cloroformo hasta una concentración final del 5 % (v/v), se mezcla y se incuba durante 15 min a TA.
9. Se centrifuga durante 10 min a 500 g para eliminar los restos celulares.
10. Se transfiere el sobrenadante a un tubo de polipropileno. Si el sobrenadante permanece turbio, se repiten los pasos 8 y 9. Si, por el contrario, es translúcido se añade cloroformo hasta una concentración final del 0.3 % (v/v) y DMSO hasta el 7 % (v/v). Se dispensa en alícuotas que se almacenan a 4 °C las que vayan a usarse y a -80 °C el resto de ellas.

23. TÉCNICA DE RLM-RACE (RNA Ligase Mediated-Rapid Amplification of cDNA Ends)

En este trabajo se utiliza el producto GeneRacer™ Kit (Invitrogen), para analizar la región 5' no codificante de los mRNAs del gen *gla66* de *T. harzianum*.

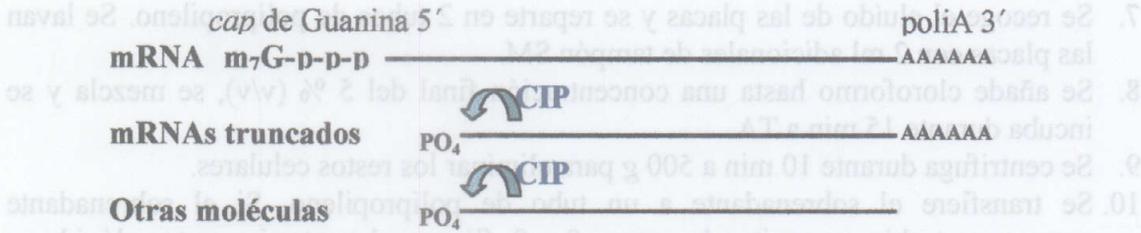
Este método se aplica para determinar sitios heterogéneos de inicio de la transcripción, caracterizar regiones promotoras, determinar la secuencia completa de un cDNA y así como las regiones 5' y 3' no codificantes de un gen. Esta técnica permite descartar aquellos mensajeros truncados que generan variabilidad en el resultado final. Así pues, sólo se manipulan los mRNAs completos, que ofrecen una información fidedigna acerca de los parámetros anteriormente mencionados. Otra ventaja adicional es la posibilidad de utilizar RNA total.

La técnica (RLM-RACE) se basa en la ligación de un oligonucleotido de RNA (Gene Racer™ RNA Oligo) al extremo 5' de los transcritos a los que se les ha eliminado previamente el *cap* de guanina (RNA ligase-mediated, RLM), y en una rápida amplificación de los extremos del cDNA (rapid amplification of cDNA ends, RACE).

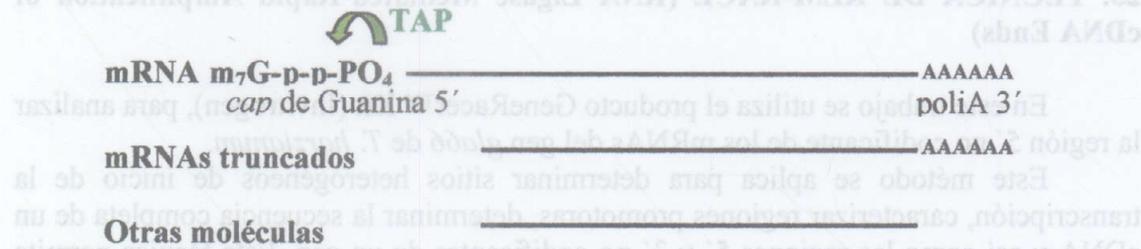
Los mensajeros truncados se descartan gracias a un proceso de desfosforilación previo a la eliminación del *cap*, impidiendo por tanto la unión del oligonucleótido, llevada a cabo por la enzima T4 RNA ligasa (Maruyama and Sugano, 1994; Schaeffer, 1995; Volloch *et al.*, 1994).

Posteriormente mediante un cebador complementario a la región de poliadenilación, se retrotranscribe el mensajero y se somete a PCR. Por último, se amplifican determinadas regiones del cDNA mediante cebadores específicos. Los productos obtenidos se subclonan y se secuencian. A continuación se detalla un esquema del proceso:

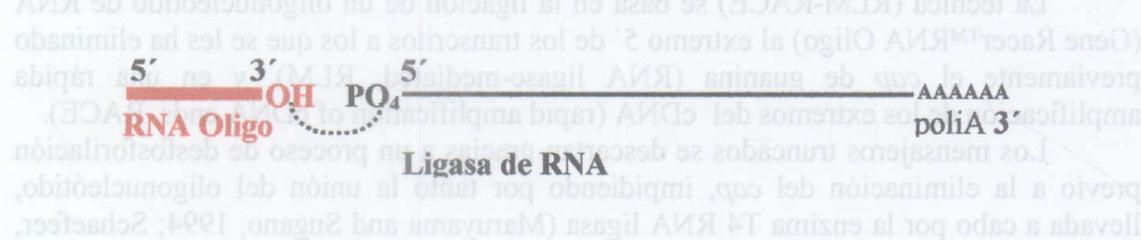
1. El RNA total o el mRNA purificado se tratan con la **fosfatasa CIP** (calf intestinal phosphatase) para eliminar los fosfatos 5' de los mensajeros truncados.



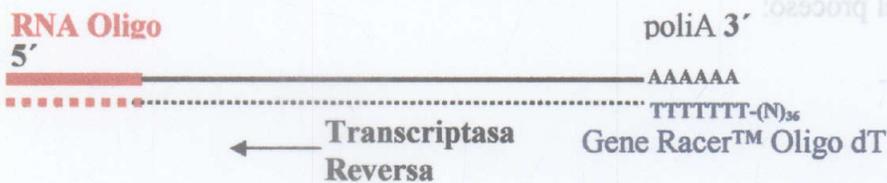
2. Los RNAs se tratan con **pirofosfatasa TAP** (tobacco acid pirofosfatase) para eliminar la estructura de guanina (*cap*) del extremo 5'.



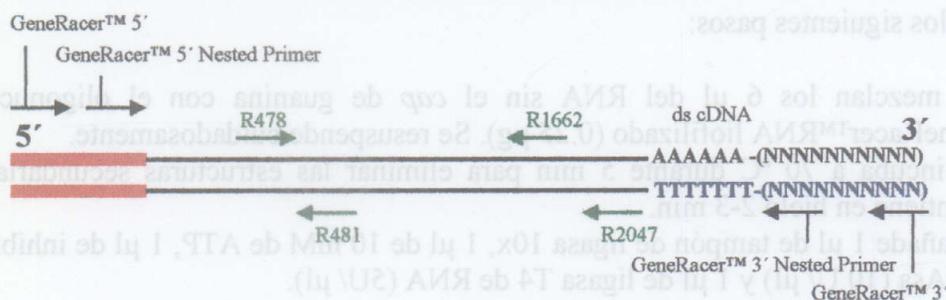
3. Se liga el oligonucleótido de RNA (RNA Oligo) a las moléculas de RNA.



4. Se retrotranscribe el RNA utilizando la transcriptasa reversa AMV-RT y el cebador complementario a la zona de poliadenilación (GeneRacer™ Oligo dT).



- Se amplifica la cadena de cDNA sintetizada utilizando cebadores homólogos al extremo 5' (GeneRacer™ 5' Primer y GeneRacer™ 5' Nested Primer), a la zona 3' (GeneRacer™ 3' Primer y GeneRacer™ 3' Nested Primer) y cebadores específicos diseñados para la secuencia de *gla66* (R478, R481, R1662, R2047). Los cebadores denominados "Nested" se utilizan para corroborar por PCR a partir de los insertos amplificados, si estos son específicos o por el contrario, son artefactos del proceso de amplificación.



- Se purifican los productos de PCR y se subclonan en el vector pCR®4-TOPO, para su posterior secuenciación.

En la siguiente sección se detalla el protocolo seguido:

23.1. DESFOSFORILACIÓN DEL RNA

- En un tubo de 1.5 ml se mezclan: 3 µl de RNA total (~5 µg), 1 µl de tampón CIP 10x, 1 µl de inhibidor de RNasa (10U/ µl), 1 µl de fosfatasa CIP y 4 µl de H₂O tratada con DEPC.
- Se incuba la mezcla a 50 °C durante 1 h y se mantiene en hielo posteriormente 2-3 min.
- Se añaden 90 µl de agua-DEPC y 100 µl de fenol:cloroformo y se agita vigorosamente durante 30 segundos.
- Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo y se añaden 2 µl de glucógeno (mussel glycogen 10 mg/ml), 10 µl de 3 M de acetato sódico pH 5.2 y 220 µl de etanol 95% (v/v).
- Se homogeniza la mezcla y se incuba en hielo 10 min.
- Se centrifuga a 13000 g durante 20 min, a 4 °C.
- El precipitado se lava con 500 µl de etanol 75%. Para ello se invierte el tubo varias veces con cuidado.
- Se centrifuga a 13000 g durante 2 min, a 4 °C.
- El precipitado se seca a TA y se resuspende en 7 µl de H₂O-DEPC.

23.2. ELIMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE GUANINA

- En un volumen final de reacción de 10 µl se mezclan: 7 µl de RNA desfosforilado, 1 µl de tampón de TAP 10x, 1 µl de inhibidor de RNasa (10U/ µl) y 1 µl de pirofosfatasa TAP (0.5 U/ µl).
- Se incuba a 37 °C durante 1 h y se mantiene en hielo posteriormente 2-3 min.
- Se repiten los pasos del 4 al 10 detallados en el apartado 23.1.

4. Se resuspende en 6 μ l de H₂O-DEPC.

23.3. LIGACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO DE RNA AL EXTREMO 5'

El oligonucleótido (GeneRacerTMRNA) ligado al extremo previamente desfosforilado del RNA contiene 44 bases y su secuencia es la siguiente: 5' CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA 3'. Se siguen los siguientes pasos:

1. Se mezclan los 6 μ l del RNA sin el *cap* de guanina con el oligonucleótido GeneRacerTMRNA liofilizado (0.25 μ g). Se resuspende cuidadosamente.
2. Se incuba a 70 °C durante 5 min para eliminar las estructuras secundarias y se mantiene en hielo 2-3 min.
3. Se añade 1 μ l de tampón de ligasa 10x, 1 μ l de 10 mM de ATP, 1 μ l de inhibidor de RNasa (10 U/ μ l) y 1 μ l de ligasa T4 de RNA (5U/ μ l).
4. Se incuba a 37 °C durante 1 h y se mantiene en hielo posteriormente.
5. Repetir los pasos del 3 al 9 detallados en el apartado 23.1.
6. Se resuspende el precipitado cuidadosamente en 13 μ l de H₂O-DEPC.

23.4. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Para retrotranscribir el producto de la ligación realizada en el apartado anterior, se utiliza el cebador GeneRacerTMOligodT Primer, de 54 bases, cuya secuencia es: 5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₁₈ 3'. Se procede según se detalla a continuación:

1. Se añade 1 μ l del cebador GeneRacerTMOligo dT Primer.
2. Se incuba a 70 °C durante 5 min para eliminar posibles estructuras secundarias y se mantiene en hielo 2-3 min.
3. Se añade 1 μ l de solución 25 mM de dNTPs, 2 μ l de tampón RT 10x, 1 μ l de retrotranscriptasa AMV-RT (5 U/ μ l) y 2 μ l de inhibidor de RNasa.
4. Se incuba a 42 °C durante 1 h.
5. Tras la retrotranscripción, se incuba la mezcla durante 15 min a 85 °C, o bien 2 min a 94 °C, para inactivar la enzima.
6. Se almacena a -20 °C, o bien se continúa con el proceso de amplificación.

23.5. AMPLIFICACIÓN DEL cDNA

Para llevar a cabo este proceso, se realizan en primer lugar amplificaciones que abarcan distintas regiones solapantes del cDNA. Para ello se utilizan cebadores específicos comerciales homólogos a la zona 5' adicionada previamente al mRNA (GeneRacerTM 5' Primer) y homólogos a la cola de poliA del cDNA (GeneRacerTM 3' Primer). En las amplificaciones realizadas a partir de regiones internas, los cebadores específicos se diseñan según el siguiente criterio:

- El contenido en GC debe oscilar entre el 50 y el 70%, para conseguir una T_m mayor de 70 °C, lo que contribuye a una mayor especificidad en la reacción.
- La longitud debe estar comprendida entre 23-28 nucleótidos.

- Se debe minimizar el contenido en GC en la últimas cinco bases del cebador, especialmente en el extremo 3'; esto es, que no posea más de dos nucleótidos G o C.
- Deben evitarse secuencias que complementen consigo mismas, especialmente en la zona 3'.

En segundo lugar, para comprobar la especificidad de los productos amplificados y descartar posibles artefactos, se efectúan sobre ellos reacciones de PCR con cebadores comerciales específicos de regiones más internas (GeneRacer™ 5'y 3' Nested Primers, ver punto 5 del apartado 23).

La polimerasa que se utiliza en las reacciones de amplificación es la Pwo Polymerase (Roche), como se describe previamente en el apartado 7.4. El proceso consta de las siguientes fases de temperatura y tiempo:

- Un ciclo: 94 °C, 2 min
- Treinta ciclos: 94 °C, 15 s; 68 °C, 45 s, 72 °C, el tiempo se adecúa a la reacción considerando que es necesario 1 min/kb amplificada.
- Un ciclo: 72 °C, 7 min.

Para los procesos de amplificación se usa 68 °C como Tm media. Las zonas pertenecientes al DNA molde frente a las que se diseñan los cebadores específicos para el RACE, se detallan en el capítulo 3 del presente trabajo. A continuación se especifica la secuencia y la Tm de los cebadores utilizados en el RACE:

Cebador	Secuencia	Bases	Tm
GeneRacer™ 5' Primer	5' CGACTGGAGCACGAGGACACTGA 3'	23	74 °C
GeneRacer™ 5' Nested Primer	5' GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA 3'	26	78 °C
GeneRacer™ 3' Primer	5' GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG 3'	25	76 °C
GeneRacer™ 3' Nested Primer	5' CGCTACGTAACGGCATGACAGTG 3'	23	72 °C
R481	5' AAGAGAGCCAGAGGGGTTTGAGAT 3'	24	71.4 °C
R478	5' GGGATCTCAAACCCCTCTGGCTCTC 3'	25	78.3 °C
R1662	5' AACGGAAGTCGGGGTAGCACAGGAATGG 3'	28	77.7 °C
R2047	5' TTTCAATCCCCCATCTTCCATCTG 3'	24	70.5 °C

Tabla 5. Cebadores utilizados para la técnica de RACE-RLM

Tras los distintos procesos de PCR, se purifican los fragmentos de DNA amplificados como se describe en el apartado 3.3. A continuación, ya que la enzima Pwo deja extremos romos, se efectúa la adición de adeninas a los extremos del inserto como se describe en el apartado 7.4.1. Posteriormente, los fragmentos de DNA se subclonan en el vector pCR®4-TOPO y se transforma la cepa de *E. coli* correspondiente, con el producto de ligación. Los clones positivos se utilizan como material de partida para la obtención de plásmido y su posterior secuenciación.

Capítulo I

Regulación del gen *chit33* de *Trichoderma harzianum*

Introducción I

★**Endoquitinasas** (EC 3.2.1.14): Son las quitinasas a las que se hace referencia en la Nomenclatura Enzimática descrita por Webb (1992). Genera cortes aleatorios en la quitina y en los quitooligómeros, liberando una mezcla de productos de diferente tamaño, que son solubles y de bajo peso molecular (Figura I.1A). Mayoritariamente se genera diacetilquitobiosa [(NAGa)₂].

★**Quitin-1,4-β-quitobiosidasa** (quitobiosidasas): Engloba a exoquitinasas que hidrolizan la quitina y los quitooligómeros generando como producto final (NAGa)₂ (Figura I.1B). Este tipo de enzimas y sus características han sido ampliamente descritos en la literatura (Harman *et al.*, 1993; Lorito *et al.*, 1993). El término quitobiosidasa no está oficialmente reconocido por la Nomenclatura Enzimática, y se tomó por analogía con la nomenclatura de las enzimas celulolíticas (Webb, 1992).

★**β-N-acetilhexosaminidasa** (EC 3.2.1.52): Incluye aquellas enzimas que degradan la quitina y los quitooligómeros desde su extremo reductor generando como único producto de hidrólisis N-acetil-D-glucosamina (Figura I.1C). En la Nomenclatura Enzimática se las denominó en un principio como quitobiasas (EC 3.2.1.52) y N-acetil-β-D-glucosaminidasa (EC 3.2.1.30), nombres que fueron posteriormente descartados.

2. LAS QUITINASAS DE *T. harzianum*

El sistema de quitinasas de *Trichoderma* se ha estudiado en detalle, debido a la importancia que poseen dentro del antagonismo y a su uso potencial en la industria, en la medicina y en los programas de control biológico. Aunque la producción de hidrolasas o CWDEs (Cell Wall Degrading Enzymes) por parte de *Trichoderma* se conoce desde hace tiempo, fue hace unos años cuando comenzaron a purificarse y a caracterizarse muchas de estas enzimas, entre las que además de quitinasas, se hallaron glucanasas, proteasas, lipasas y amilasas, entre muchas otras (Lorito, 1998).

Las quitinasas se han descrito en numerosas especies de *Trichoderma*, aunque el sistema enzimático más estudiado hasta el momento ha sido el de *T. harzianum* (Tabla I.1).

2.1. PRINCIPALES FUNCIONES

Las quitinasas fúngicas están implicadas en procesos biológicos tan diversos como la obtención de nutrientes, la defensa y la morfogénesis; aunque son pocos los estudios de disrupción génica en *Trichoderma*, que permiten afirmar la función específica de estas enzimas.

En la **morfogénesis**, las quitinasas intervienen en procesos como la elongación de las hifas y su ramificación, la separación celular, la germinación de las esporas, la respuesta a daños mecánicos y la autólisis (Gooday, 1990; Sahai y Manocha, 1993). Su localización es intracelular, aunque pueden hallarse en el espacio periplásmico. Aunque en *Trichoderma* no existen pruebas que demuestren fehacientemente la función de las quitinasas en los procesos morfogénicos, se han realizado trabajos cuyos resultados sugieren que estas enzimas posiblemente estén implicadas en éstos. Tal es el caso de la quitinasa CHIT102, que se detecta intracelularmente en condiciones de no inducción (Haran *et al.*, 1995), o de la actividad hexosaminidasa que en *T. harzianum* P1 está asociada a la pared celular (Peterbauer *et al.*, 1996).

Enzima	Cepa	Actividad enzimática	Gen	
CHIT102	TM	<i>hexosaminidasa</i>		
CHIT72 (CHIT73)	P1 TM IMI298372	<i>hexosaminidasa</i>	<i>nagl</i> <i>excl</i>	(Peterbauer <i>et al.</i> , 1996) (Draborg <i>et al.</i> , 1995)
CHIT64	39.1	<i>hexosaminidasa</i>		
CHIT52	TM	<i>endoquitinasa</i>		
CHIT42	39.1 CECT2413 P1 TM	<i>endoquitinasa</i>	<i>ThEn-42</i> <i>chit42</i> <i>ech-42</i> <i>chil</i>	(Hayes <i>et al.</i> , 1992) (García <i>et al.</i> , 1994) (Carsolio <i>et al.</i> , 1994) (Draborg <i>et al.</i> , 1996)
CHIT40	P1	<i>quitobiosidasa</i>		
CHIT37	CECT2413	<i>endoquitinasa</i>		
CHIT36	TM	<i>endoquitinasa</i>	<i>chit36</i>	Viterbo <i>et al.</i> , 2001
CHIT33	CECT2413 TM	<i>endoquitinasa</i>	<i>chit33</i>	Limón <i>et al.</i> , 1995
CHIT31	TM	<i>endoquitinasa</i>		
CHIT28	TM198	<i>hexosaminidasa</i>		

Tabla I.1. El sistema quitinolítico de *T. harzianum* (basado en Lorito, 1998)

Por otro lado, las quitinasas pueden intervenir en el **antagonismo** y en el **saprofitismo**. En el caso de la quitinasa CHIT33, la ausencia de determinados dominios en su secuencia, presentes en aquellas quitinasas implicadas en morfogénesis, sugiere un papel nutricional para esta enzima (Limón *et al.*, 1995); además, el aumento de la capacidad de biocontrol en cepas transformantes superproductoras de CHIT33, apoya este hecho (Limón *et al.*, 1999). Otra de las quitinasas implicadas en el biocontrol es la CHIT42. En el caso de *T. harzianum* P1 se ha demostrado que la disrupción del gen *ech42* afecta negativamente a su capacidad antagonista frente a la mayoría de los patógenos ensayados (Woo *et al.*, 1999). La superproducción de CHIT42 y CHIT36 en las cepas CECT 2413 y TM, respectivamente, potencia el antagonismo de éstas frente a los patógenos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*, lo cual refuerza la función de estas enzimas en el micoparasitismo (Limón, 1999, Tesis Doctoral; Viterbo *et al.*, 2001). Sin embargo, no ocurre lo mismo con la quitinasa Ech42 de *T. harzianum* IMI 206040, cuya disrupción génica no afecta en absoluto al antagonismo ejercido por la cepa, por lo que no se considera una enzima esencial en este proceso (Carsolio *et al.*, 1999). En el caso de la cepa *T. virens* Gv29-8, se ha demostrado que la endoquitinasa extracelular codificada por el gen *cht42*, está implicada en el micoparasitismo ejercido sobre *R. solani*; la sobreexpresión y la disrupción del gen *cht42* en esta cepa, mejora y reduce respectivamente, de forma significativa, el control ejercido sobre el patógeno (Baek *et al.*, 1999).

2.2. REGULACIÓN DE LAS QUITINASAS EN *T. harzianum*

2.2.1. Mecanismos de inducción

La regulación de las diversas quitinasas de *Trichoderma* ha sido objeto de estudio desde hace años, con el fin de conocer de qué forma están implicadas en el micoparasitismo y a qué responde su síntesis.

Hasta el momento, numerosos trabajos describen la influencia de determinadas fuentes de carbono sobre la expresión de las quitinasas (Dana *et al.*, 2001; García *et al.*, 1994; Limón *et al.*, 1995; Mach *et al.*, 1999; Peterbauer *et al.*, 2002; Zeilinger *et al.*, 1999). Estos estudios *in vitro*, han tratado de mimetizar las condiciones que pueden darse en el antagonismo. De este modo, se ha comprobado que la mayoría de las quitinasas se inducen en presencia de quitina, paredes celulares fúngicas o micelio, como fuentes de carbono. Los oligómeros producidos en la hidrólisis de quitina, la carencia de nutrientes, situaciones de estrés o incluso estímulos lumínicos, inducen la síntesis de quitinasas en *Trichoderma* (Carsolio *et al.*, 1994; Dana *et al.*, 2001; García *et al.*, 1994; Mach *et al.*, 1999; Peterbauer *et al.*, 1996).

Diversos estudios realizados frente a paredes celulares y micelio de hongos hospedadores, han profundizado sobre el mecanismo de inducción. En el caso de la glucosaminidasa CHIT102, el reconocimiento por parte de *T. harzianum* de una lectina purificada de la pared celular del patógeno *S. rolfsii*, induce la expresión de esta quitinasa, por lo que su activación depende de una interacción lectina-carbohidrato y no de la presencia de quitina (Inbar & Chet, 1992). Por otro lado, el uso de micelio autoclavado como fuente de carbono induce la expresión de las quitinasas CHIT33 y CHIT42 en mayor medida que la quitina (García *et al.*, 1994; Limón *et al.*, 1995); incluso el uso de micelio autoclavado de *Phytophthora*, que carece prácticamente de quitina, induce aunque en menor medida la expresión de CHIT42 (García *et al.*, 1994), lo que demuestra que la presencia de componentes de la pared celular del hospedador,

es importante en la expresión de estas enzimas. En el caso de las quitinasas CHIT73 y CHIT102, su expresión se ve afectada de forma negativa si *Trichoderma* se incuba con micelio autoclavado de *S. rolfsii*, lo que sugiere que para la inducción, son necesarios elementos procedentes del hospedador vivo (Inbar & Chet, 1995).

La realización de cultivos duales ha manifestado la existencia de un **mecanismo secuencial** en la activación de las quitinasas. En experimentos de confrontación de *T. harzianum* con el patógeno *S. rolfsii*, la quitinasa CHIT102 aparece en el momento del contacto entre ambos micelios, disminuyendo su expresión a medida que avanza la interacción, aumentando por el contrario la expresión de la quitinasa CHIT73 (Inbar & Chet, 1995). En ensayos frente a *R. solani*, el gen *ech42* se induce en etapas previas al contacto con el patógeno, mientras que el gen *nagl* sólo se activa una vez que se produce la interacción entre ambos (Zeilinger *et al.*, 1999).

Por otro lado, los ensayos duales han mostrado que el antagonismo ejercido por *T. harzianum*, comprende actividades enzimáticas diferentes según el hongo hospedador utilizado. Por tanto, existen procesos específicos según el patógeno al que se micoparasma, que delimita el rango de hospedadores de cada cepa de *Trichoderma*. En el caso de *R. solani*, se inducen las quitinasas CHIT52, CHIT42, CHIT33 y CHIT102, lo que contribuye a que la interacción con el hospedador sea eficiente; no ocurre lo mismo si se confronta con *S. rolfsii*, donde sólo se expresan la CHIT102 y la CHIT73, mostrando una interacción ineficaz (Chet *et al.*, 1998).

Las quitinasas parecen estar sujetas a **represión catabólica** por glucosa. Incluso en presencia de inductores, la adición al medio de cultivo de cantidades crecientes de glucosa, reprime la expresión de numerosas enzimas hidrolíticas, entre ellas, las quitinasas. El glicerol en *Trichoderma*, puede actuar como fuente de carbono neutra; aunque en el caso de las enzimas CHIT42 y CHIT33, actúa como represora (Carsolio *et al.*, 1994; Dana *et al.*, 2001; García *et al.*, 1994; Mach *et al.*, 1999). En algunos casos, se ha descrito un nivel basal de expresión incluso en presencia de una fuente de carbono represora, lo que podría contribuir a una primera actuación sobre el hongo hospedador o sustrato, que liberara oligómeros o componentes que actuaran como elicitores en el micoparasitismo (Kullnig *et al.*, 2000; Limón *et al.*, 1995; Margolles-Clark *et al.*, 1996; Zeilinger *et al.*, 1999). De este modo, las quitinasas constituirían piezas clave en las etapas previas al micoparasitismo.

En conclusión, el sistema quitinolítico de *Trichoderma* responde a estímulos específicos, como el reconocimiento de un componente en la pared celular del hospedador (Inbar & Chet, 1995); y a estímulos inespecíficos, como el estrés fisiológico producido por la carencia de nutrientes, luz, etc.

2.2.2. Estructura de las secuencias reguladoras. Estudios de regulación génica

El estudio de los promotores de numerosos genes de enzimas hidrolíticas, que intervienen en el micoparasitismo, muestra la existencia de secuencias consenso de unión a factores transcripcionales, relacionados con la represión catabólica por glucosa (CREA), con la regulación por nitrógeno (AREA), y con la respuesta a situaciones de estrés (STRE) o choques térmicos (HSE), entre otros.

La **represión mediada por la glucosa** se ha estudiado extensamente en *A. nidulans*, donde interviene el factor CREA, cuya función ha sido probada en numerosos análisis moleculares y genéticos (Kulmburg *et al.*, 1993). CREA regula negativamente la transcripción al unirse a secuencias específicas del promotor, cuyo consenso es 5'-SYGGRG-3'. El reconocimiento de esta secuencia ocurre por medio de los dos dedos de zinc, de tipo C₂H₂, que contiene el factor de transcripción.

El gen *creA* se ha clonado en varios hongos filamentosos, siendo la homología entre ellos bastante alta; en *S. cerevisiae* su equivalente es el gen *MIG1* (Nehlin & Ronne, 1990). En *T. reesei* y *T. harzianum* se ha clonado el gen *cre1*, que presenta un 46% de homología con el gen *creA* de *A. nidulans* (Ilmén *et al.*, 1996a). La secuencia consenso de unión al promotor, semejante a la de *Aspergillus*, se ha encontrado en las regiones 5' reguladoras de varios genes de xilanasas y celulasas de *T. reesei*, y de un gen de quitinasa de *T. harzianum* (Lorito *et al.*, 1996b; Mach *et al.*, 1996; Zeilinger *et al.*, 1996). El factor CRE1 necesita ser fosforilado para unirse al DNA, al contrario que MIG1, que se inactiva al fosforilarse (Kubicek-Pranz, 1998).

La unión de CRE1 al promotor del gen *ech42* ha sido objeto de estudio, en el análisis molecular del proceso de interacción de *T. harzianum* con *B. cinerea*. Los resultados sugieren que tras la interacción con el patógeno, se une un complejo proteico a la región reguladora, que contribuye a la liberación de CRE1 del promotor, incluso en presencia de glucosa. Este complejo actuaría como regulador positivo en la expresión de *ech42* (Lorito *et al.*, 1996b). Otro trabajo realizado, relacionado con CRE1, ha consistido en la obtención de la cepa RutC30 de *T. reesei*, que superproduce celulasas al tener mutado un alelo *cre1* (Ilmén *et al.*, 1996a). Este trabajo ha sido muy útil para la obtención de cepas hiperproductoras de enzimas hidrolíticas (Margolles-Clark *et al.*, 1996).

La represión existente en presencia de glicerol, como fuente de carbono, de determinados genes en *Trichoderma* (Carsolio *et al.*, 1994; Dana *et al.*, 2001, García *et al.*, 1994, Mach *et al.*, 1999), plantea la existencia de otra forma alternativa de represión independiente a la generada por CRE1.

En cuanto a la regulación mediada por otras fuentes de carbono, cabe destacar el trabajo realizado por Peterbauer y colaboradores (2002a), donde identifican un elemento de respuesta a N-acetil-glucosamina en el promotor del gen *nag1*, que codifica una glucosaminidasa en la cepa *T. harzianum* P1. Este elemento consta de una secuencia palindrómica 5'-CCAGN₁₃CTGG-3', que contiene en su región central una caja 5'-CCAAT-3'. La mutagénesis de este elemento y de otro de secuencia similar al motivo de respuesta a estrés general (5'-CCCCT-3'), genera la pérdida de inducción por N-acetil-glucosamina.

En cuanto a la **regulación mediada por nitrógeno** en hongos, el factor transcripcional se une a la secuencia consenso 5'-HGATAR-3', ejerciendo de regulador positivo en condiciones de carencia de nitrógeno. En *A. nidulans* interviene el factor AreA, codificado por el gen *areA*, que interviene en la transcripción de más de cien genes implicados en la utilización del nitrógeno (Arst & Cove, 1973). La unión de AreA se lleva a cabo mediante interacciones hidrofóbicas entre su dedo de cinc y la primera base de la secuencia consenso (Ravagnani *et al.*, 1997). Actualmente se conocen genes homólogos en otros hongos, como por ejemplo el gen *nit-2* en *N. crassa* (Fu & Marzluf, 1990). Aunque numerosos genes de *Trichoderma* contienen en sus promotores cajas 5'-HGATAR-3', todavía no se ha demostrado si éstas son funcionales. Se ha comprobado en el gen *chit33* de *T. harzianum*, cuya secuencia promotora contiene cajas 5'-HGATAR-3', que su expresión se induce al bajar cien veces la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (Dana *et al.*, 2001).

En la respuesta a estrés general, los factores específicos de transcripción se unen a la secuencia consenso 5'-WAGGGG-3' o **secuencia STRE (STress Response Element)**. En *S. cerevisiae* se han descrito los factores Msn2p y Msn4p, que interaccionan con la caja consenso por medio de sus dedos de zinc de tipo C₂H₂ (Ruis & Schüller, 1995). En *T. harzianum* P1 se ha descrito recientemente el factor de transcripción Seb1 (Peterbauer *et al.*, 2002b), producto del gen *seb1*, que presenta una

homología del 64% con los factores Msn2/4p de *S. cerevisiae*. Los experimentos de disrupción génica llevados a cabo relacionan a este gen con la respuesta a estrés osmótico, pero no parece estar implicado en la respuesta a otro tipo de agentes estresantes, como cadmio, pH o daños en la membrana (Peterbauer *et al.*, 2002b)

El motivo STRE se ha localizado en los promotores de genes de quitinasas de *Trichoderma*, como el *ech42*, *nag1* y *chit33* (Dana *et al.*, 2001; Lorito *et al.*, 1996b, Peterbauer *et al.*, 2002b). Aunque su implicación en la respuesta a estrés no se ha demostrado hasta el momento, algunas de estas quitinasas sí responden a determinadas situaciones de estrés fisiológico, como presión osmótica, presencia de etanol, bajas temperaturas y altas temperaturas (Dana *et al.*, 2001; Mach *et al.*, 1999).

Resultados que relacionan al elemento STRE con otras funciones, sugieren que a este motivo pueden unirse proteínas implicadas en procesos muy diversos. Por ejemplo, en el caso del promotor del gen *nag1*, que no responde a estrés, se ha visto que la secuencia 5'-CCCCT-3' es necesaria para que se active por N-acetil-glucosamina (Peterbauer *et al.* 2002a). En el caso de *Yarrowia lipolytica*, a este motivo se une la proteína Mhy1p, cuya producción aumenta considerablemente en la transición de levadura a hifa (Hurtado & Rachubinski, 1999).

Otro elemento de interés que encontramos en los promotores de numerosos genes de enzimas hidrolíticas, es el relacionado con la respuesta a choque térmico o HSE (Heat Shock Elements). Los HSE se han estudiado extensamente en levaduras y eucariotas en general (revisado en Mager & Kruiff, 1995). Contienen el consenso 5'-nGAAn-3', que puede hallarse repetido de 3 a 6 veces, en orientaciones alternativas. El espacio entre cada elemento repetido varía desde 3 a 85 pares de bases, siendo también variable la distancia de los elementos al origen de transcripción. La secuencia del HSE está muy conservada, las adeninas pueden cambiar en la secuencia, pero la guanina está totalmente conservada, de hecho, su sustitución por otra base anula totalmente la función de la caja en el promotor. A los HSE se les unen los factores HSF, que en estado inactivo se encuentran como monómeros en el citoplasma sin capacidad de unirse al DNA. La existencia de una situación de estrés por choque térmico, conduce a la formación de homotrímeros con capacidad de unión al HSE.

Aunque su funcionalidad no ha sido demostrada aún en *Trichoderma*, la activación de la quitinasa *chit33* bajo choque térmico, sugiere que el HSE presente en su promotor, pudiera estar implicado (Dana *et al.*, 2001).

En cuanto a los estudios de regulación génica realizados en *Trichoderma*, han sido varios los marcadores utilizados para el análisis de promotores. Los primeros estudios se llevaron a cabo con los genes *lacZ* y *uidA*, que codifican la β -galactosidasa y la β -glucuronidasa, respectivamente. El uso de estos marcadores ha permitido analizar cuantitativamente las regiones reguladoras de los genes *cbh1* y *cbh2* de *T. reesei* (Mach & Zeilinger, 2003). En estudios posteriores se ha utilizado el gen *hph* de *E. coli*, que codifica la higromicina B fosfotransferasa, para analizar los promotores de dos genes de xilanasas de *T. reesei*, *xyn1* y *xyn2* (Mach *et al.*, 1996; Zeilinger *et al.*, 1996).

Los promotores de los genes *ech42* y *nag1* de *T. harzianum* P1 y el del gen *chit33* de *T. harzianum* CECT 2413, han sido analizados con los genes marcadores de la glucosa oxidasa *goxA* de *A. nidulans* y del gen *gfp* de *Aquorea victoria* (Dana *et al.*, 2001; Mach *et al.*, 1999; Zeilinger *et al.*, 1999). La utilización de estos sistemas ha permitido realizar un estudio pormenorizado, respecto al efecto generado por diversas fuentes de carbono y situaciones de estrés en los promotores.

El gen *gfp* se ha utilizado en otras ocasiones para realizar un seguimiento sobre la colonización del hongo en el suelo; en comparación con los marcadores *lacZ* y *uidA*,

resulta un sistema sencillo, pues no necesita de sustrato para reaccionar y además *Trichoderma* no presenta actividad residual (Yeoung-Senk *et al.*, 2000). El gen marcador *goxA*, ha permitido analizar cuantitativamente la expresión de promotores nativos y ha constituido igualmente una herramienta útil en el análisis de delección de estos en *Trichoderma* (Dana *et al.* 2001; Mach *et al.*, 1999; Peterbauer *et al.*, 2002a).

1. LA REGIÓN REGULADORA DE *chit33*

La región reguladora del gen que codifica la quitinasa de 33 kDa (CHIT33) de *T. harzianum* CECT 2413, se aisló a partir de una genoteca de DNA genómico (gDNA) [Limón, 1999, Tesis Doctoral], construida previamente en Lambda GEM[®]-11 (Lora, 1994, Tesis Doctoral). Para ello se utilizó como sonda el cDNA completo correspondiente al gen *chit33* (Limón *et al.*, 1995). De los tres clones genómicos aislados, se escogió para este estudio el clon S1, que contenía parte de la región 5' no codificante del gen *chit33* y 2.1 kb que incluían la región promotora del DNA genómico de *chit33* (Figura I.2).

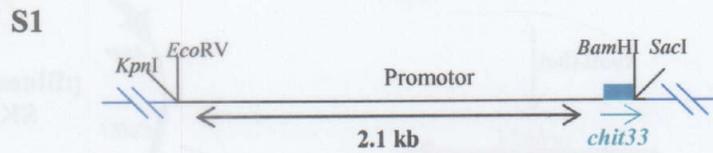


Figura I.2. Esquema del clon utilizado para el aislamiento del promotor del gen *chit33*

La secuencia de S1 se utilizó para diseñar dos cebadores específicos, los cuales amplificarían una región de 1.4 kb, que englobaría la región reguladora del gen *chit33*, a la que se llamó *pchit33*. Los cebadores se denominaron Xho 5' (5'-AGCTCGAGTGGGATGTATCCTCTTTAAGTGC-3') y Xba 3' (5'-CCTCTAGATGCTGAGGCTATCGGATC-3'), atendiendo a la orientación que presentaban respecto al promotor.

El oligómero Xba3' se posicionó 15 pb aguas arriba del inicio de la traducción de la proteína, por lo que amplifica parte de la secuencia 5' no codificante. Las secuencias de los cebadores, incluían las dianas *XhoI* y *XbaI*, lo que permitía subclonar de forma dirigida el inserto obtenido tras la amplificación. La PCR se llevó a cabo con enzimas de alta fidelidad, para evitar la generación de errores de secuencia, tal y como se describe en el apartado 7.4 de *Materiales y Métodos*. El inserto amplificado, se digirió con las enzimas correspondientes y se subclonó en el vector pSK, obteniéndose así la construcción pSK-*pchit33* (Figura I.3).

Una vez obtenido el clon pSK-*pchit33*, se procedió a su secuenciación, para corroborar y analizar la región reguladora de la quitinasa. El análisis del promotor reveló la existencia de secuencias consenso o cajas putativas, que podrían estar implicadas en la regulación transcripcional de la quitinasa CHIT33. Por un lado, se hallaron una caja 5'-TATAA-3' en la posición -108, y tres cajas 5'-CCAAT-3' en las posiciones -826, -643 y -202. Éstas últimas, son secuencias activadoras de la transcripción, existentes en diversos organismos y comunes en numerosos genes. En el caso de las levaduras, se les une una proteína heterotrimérica que actúa como complejo de activación. En hongos filamentosos, este motivo consenso también se ha descrito; y particularmente en el caso de *Trichoderma*, se ha referido a genes de xilanasas y celulasas de *T. reesei* (Zeilinger *et al.*, 1996,1998)

Por otro lado, se localizaron motivos 5'-HGATAR-3' en las posiciones -365 y -704, relacionados con el factor AreA, implicado en la utilización de nitrógeno en *A.*

nidulans (Ravagnani *et al.*, 1997). En la posición -156 se localiza la secuencia 5'-SYGGRG-3', consenso para la unión del factor CreA/Cre1, relacionado con la represión por catabolito de carbono (Kulmburg *et al.*, 1993; Cubero & Scazzocchio, 1994; Ilmén *et al.*; 1997).

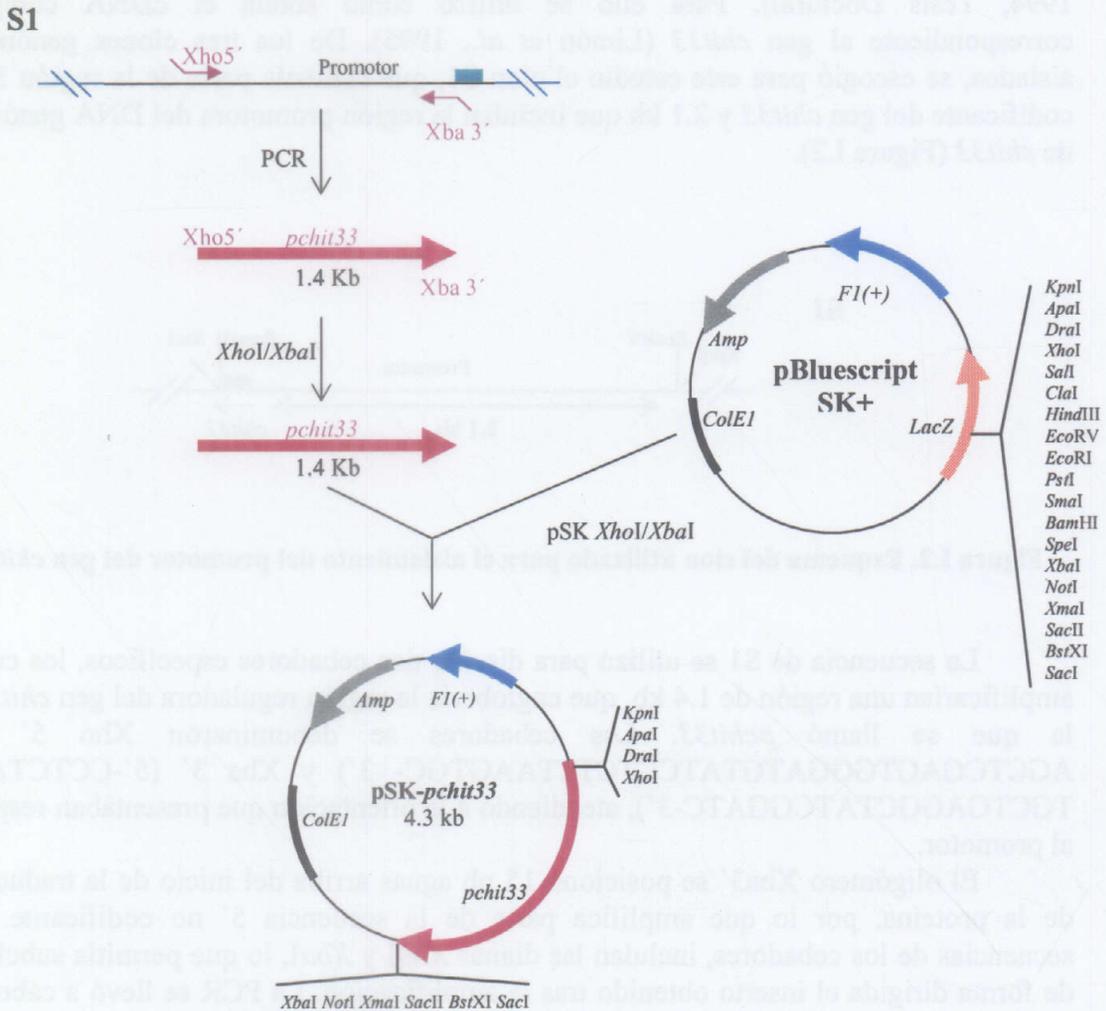


Figura I.3. Obtención de la construcción pSK-*pchit33*

Otro de los motivos consenso hallados en el promotor, localizado en la posición -511, está relacionado con la respuesta a estrés general (5'-CCCCT-3'). En el caso de las levaduras, están implicados los factores Msn2p/Msn4p (Marchler *et al.*, 1993); y en *T. atroviride* el factor Seb1, que participa en la respuesta frente a estrés osmótico (Peterbauer *et al.*, 2002b). Seb1 presenta homología con los factores de transcripción Msnp de levaduras, en la región correspondiente al dedo de zinc.

La respuesta a estrés térmico en levaduras y otros eucariotas, está directamente relacionada con la existencia de secuencias HSE (heat-shock-elements) funcionales en el promotor. El motivo HSE, cuyo consenso es 5'-nGAAn-3', aparece repetida de 3 a 6

veces en orientaciones alternativas (Mager & Kruiff; 1995). En *chit33*, se encuentra una secuencia que podría funcionar como HSE en la posición -1342 del promotor.

Por el contrario, no se encontraron secuencias homólogas en un 100% a los cuatro motivos MYC (5'-GGCAWTCGGCAT'-3', 5'-GGGCAC-3', 5'-TTGGCAA-3' y 5'-GCTTCA-3'), descritos en las regiones 5' reguladoras de los genes *ech42* y *prb1* de *T. atroviride* IMI 206040, los cuales parecen estar implicados en el proceso de micoparasitismo (Cortés *et al.*, 1998). Tampoco se halló ninguna secuencia homóloga al motivo relacionado con la activación por N-acetil-glucosamina (NAGa) descrito en el gen *nag1* de *T. harzianum* P1. Este motivo, 5'-CCAGN₁₃CTGG-3', incluye una caja CCAAT en el espaciador que contiene (Peterbauer *et al.*, 2002a).

En la Figura I.4, se muestra un esquema de las posibles cajas implicadas en la regulación de *chit33*.

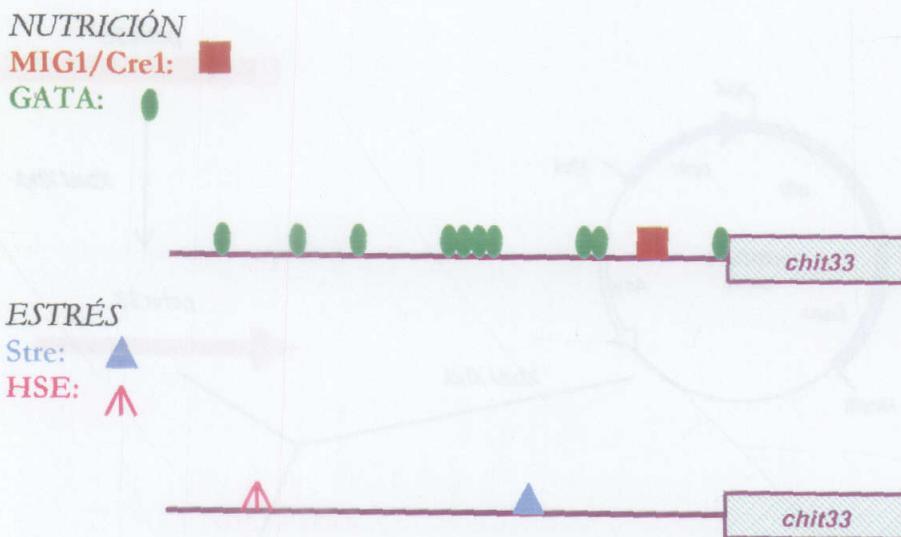


Figura I.4. Secuencias reguladoras putativas halladas en *pchit33*. En el presente esquema podemos observar las posibles cajas de unión a reguladores de la transcripción. Se representan las relacionadas con la nutrición celular, como las implicadas en la represión catabólica por carbono, mediante *MIG1/Cre1*; y en el metabolismo del nitrógeno, como *GATA*. Por otro lado se esquematizan aquellas relacionadas con situaciones de estrés general, *Stre*; y estrés térmico, *HSE*.

2. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pZEGA33 Y pMDJ1

El objetivo principal del presente estudio, ha sido analizar cualitativa y cuantitativamente la regulación del gen *chit33*. Para ello, se realizó una fusión transcripcional del fragmento de 1.4 kb con dos genes marcadores diferentes. Por una parte, se utilizó el gen *gfp*, que codifica una versión modificada de la proteína fluorescente (GFP) de *Aquorea victoria*, que permite analizar cuándo se induce la transcripción desde la región reguladora. Por otra, se fusionó al gen *goxA* de *A. niger*, que codifica la glucosa oxidasa, que permite cuantificar la expresión del gen en distintas condiciones de cultivo.

2.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pZEGA33

Para llevar a cabo la construcción pZEGA33, se utilizó el vector pZEGA1 (Zeilinger *et al.*, 1999), que contiene el gen *gfp* bajo el promotor constitutivo de la piruvato quinasa (*ppki1*) de *T. reesei*. Este promotor se reemplazó por el de la quitinasa, tras eliminarlo de pZEGA1 por digestión y sustituirlo por el fragmento de 1.4 kb obtenido por PCR (apartado 1, *Capítulo 1*), digerido previamente con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. El esquema del proceso se detalla en la Figura I.5.

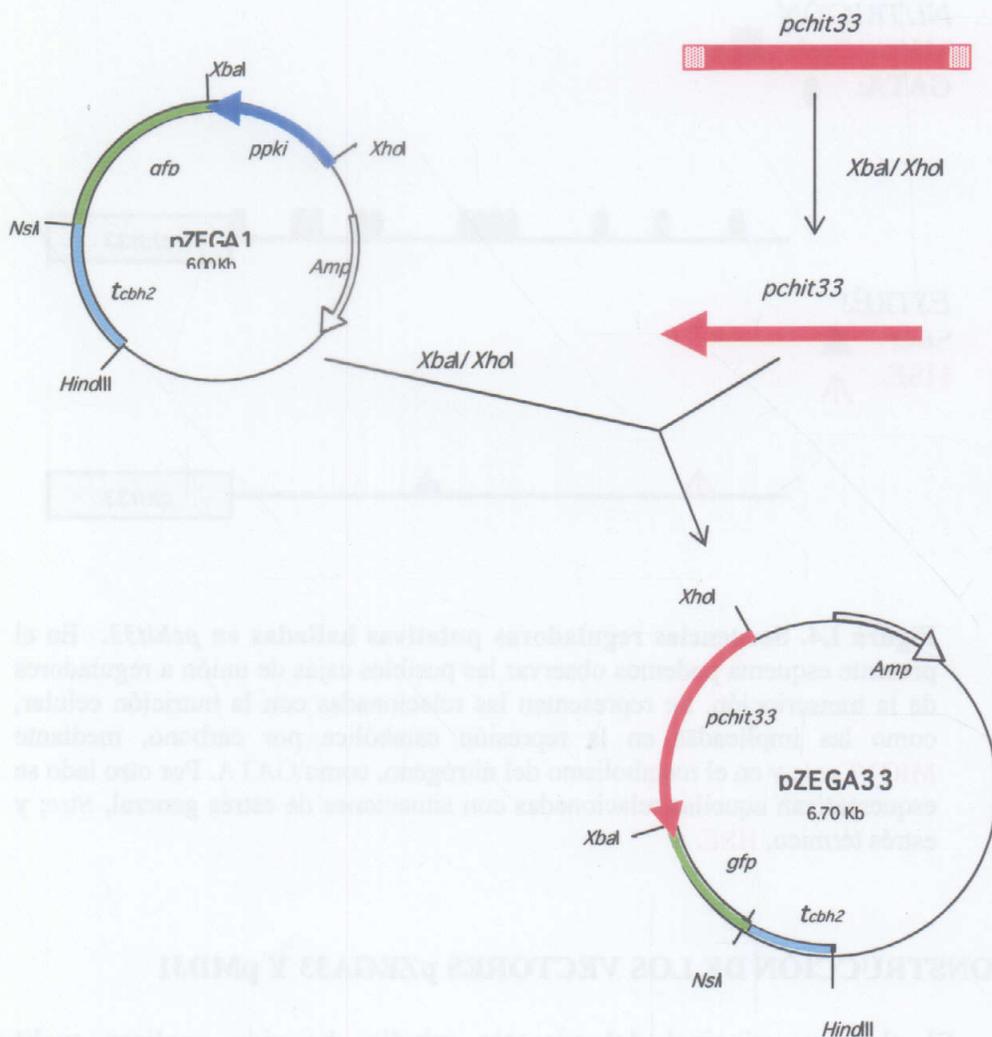


Figura I.5. Obtención del vector pZEGA33

3. OBTENCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES

3.1 PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE *T. harzianum*. ESTABILIZACIÓN DE LOS TRANSFORMANTES

La transformación DE la cepa *T. harzianum* CECT 2413 se realizó según el protocolo descrito por Penttilä *et al.*, 1987. El método básicamente consiste en la obtención de protoplastos a partir de micelio joven, y en la cotransformación de éstos, con ayuda de PEG y CaCl₂ (apartado 12.3 de *Materiales y Métodos*). En el proceso, por tanto, se utilizaron dos vectores diferentes: por una parte aquél que llevaba el gen cuya expresión se quería analizar, en este caso pZEGA33 o pMDJ1; y, por otra, aquél que portaba el gen de selección, en este caso el vector p3SR2 (Hynes *et al.*, 1988), que contiene el gen de la acetamidasa (*amdS*) de *A. nidulans*. Los protoplastos cotransformados podían, de este modo, utilizar la acetamida como fuente de nitrógeno. Para la obtención de clones que ejercieran posteriormente como controles positivos en los experimentos de inducción, la cepa se transformó con los vectores pZEGA1 y pRLM_{ex}60, respectivamente, que expresan constitutivamente los genes marcadores, ya que están bajo el control del promotor *ppk1*. Los clones utilizados como controles negativos portaban únicamente el vector p3SR2.

La eficiencia de transformación, aproximadamente de 30 transformantes por µg de vector, fue similar para todas las construcciones utilizadas. En cada caso, se seleccionaron 50 colonias para el proceso de estabilización, descrito en la Figura I.7. Las rondas de purificación efectuadas consistían en pasos sucesivos de conidiación, alternando medio selectivo con medio no selectivo. Este proceso conlleva la pérdida de los transformantes no estables y a la obtención de clones homocariontes mitóticamente estables.

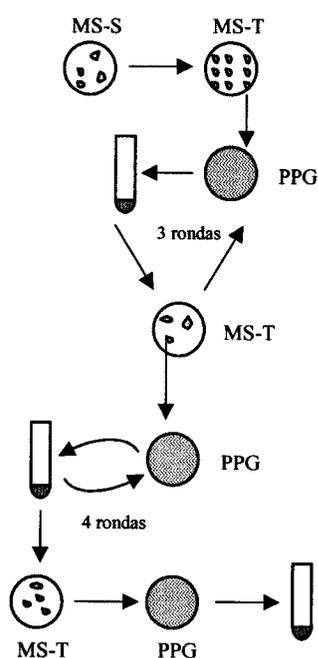


Figura I.7. Estabilización de los transformantes. Tras pasar las colonias transformantes del medio con sorbitol (MS-S) a medio selectivo con Tritón (MS-T), se realizaron rondas de crecimiento alternado medio rico (PPG) con medio MS-T. En cada paso se seleccionaron colonias aisladas, quedando atrás aquellos transformantes que resultaron inestables.

De la construcción pZEGA33, se obtuvieron once transformantes estables, cuatro de los cuales, GFP3.1, GFP3.2, GFP3.7 y GFP3.11, se seleccionaron para su posterior análisis. De igual modo, se eligieron cinco de los siete transformantes estables obtenidos a partir de la construcción pMDJ1: GOX1, GOX2, GOX4, GOX6 y GOX7.

3.2. ANÁLISIS SOUTHERN DE LOS TRANSFORMANTES

El análisis Southern se llevó a cabo, en este caso, para determinar el número de copias de *gfp* o de *goxA* existente en las cepas transformantes, ya que, los vectores que portan los genes marcadores se integran al azar en el genomio durante el proceso de transformación.

En las cepas portadoras del vector pZEGA33, el gen *gfp* se liberó del DNA genómico mediante digestión con *NsiI/XbaI* (Fig. I.5). En la Figura I.8A, se observa una banda intensa de 900 pb, correspondiente al gen *gfp*.

En las cepas transformadas con el vector pMDJ1, *goxA* se liberó del genomio por digestión con *HindIII/XbaI* (Fig. I.6), generando un inserto de 2.2 kb (Figura I.8B).

Las bandas adicionales que se aprecian en ambos casos, podrían reflejar eventos de recombinación no deseados que se han estabilizado dentro del genomio. Por este motivo, sólo se consideran las bandas con tamaño igual al del gen marcador para calcular el número de copias. Para ello, se relativizó la intensidad de la banda del transgén, con las del patrón dado por el vector original, cuya relación número de copias/intensidad se conocía. El número de copias de *gfp* en los transformantes GFP3.7 y GFP 3.8 fue aproximadamente de 4, y de 2 en los transformantes GFP3.10 y GFP 3.11. En los portadores del vector pMDJ1 se estimó un número aproximado de 2 copias en GOX1, GOX2 y GOX4; de 3 copias en GOX6 y de 4 copias en GOX7.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN

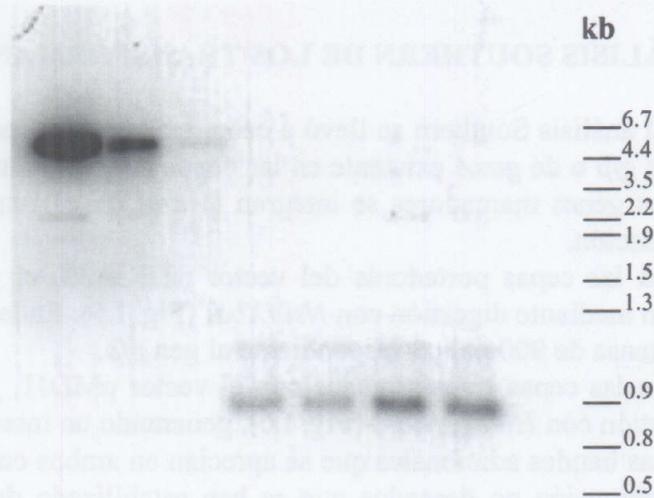
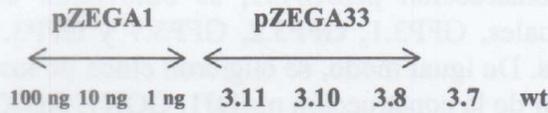
4.1. ANÁLISIS NORTHERN DE LA EXPRESIÓN DE *chit33*

Con el fin de analizar la regulación del gen *chit33* y su implicación en el antagonismo, se realizó un análisis northern de su expresión. Para ello, la cepa silvestre se cultivó bajo condiciones que mimetizaban algunas de las situaciones donde ocurre este fenómeno. En primer lugar se realizó un precultivo en MM suplementado con glucosa al 2% (apartado 2.3.2 de *Materiales y Métodos*). Una vez obtenida suficiente biomasa, el micelio se sometió a diferentes condiciones durante 8 y 24 h (Figura I.9).

Ya que la quitina es un compuesto mayoritario en la pared celular de la mayoría de los hongos a los que *T. harzianum* micoparasita, cabía esperar que el gen correspondiente a *chit33* se expresara tras la adición de este polímero al cultivo. De hecho la expresión más fuerte del gen se observó en presencia de quitina durante 24 h. La adición al medio de paredes celulares (0.2%) de *B. cinerea*, hongo micoparasitado por *T. harzianum*, indujo la expresión de *chit33* aunque en menor grado.

La carencia de fuente de carbono es un factor importante en la activación de numerosos genes en *Trichoderma*. En este estudio, se provocó esta condición de estrés nutricional cultivando el micelio en presencia de bajas concentraciones de glucosa o glicerol (0.1%). En ambos casos se observó la expresión de *chit33*, debido probablemente a su desrepresión por la falta de nutrientes.

A



B

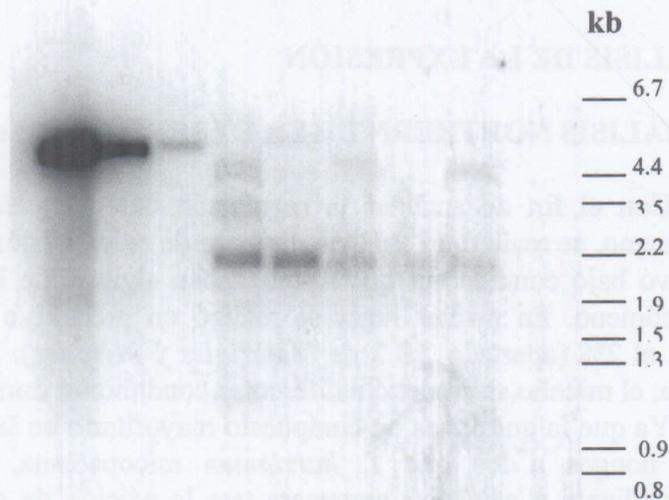
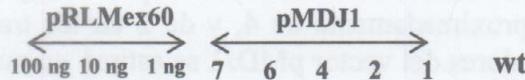


Figura I.8. Análisis Southern de la cepa silvestre y de las portadoras de los genes *gfp* y *goxA*. A, el vector pZEGA1 se linearizó digiriéndolo con la enzima *Xba*I. Como sonda se utilizó el gen *gfp*, aislado a partir de este mismo vector. B, en el caso de los transformantes portadores de la glucosa oxidasa, se utilizó el gen *goxA* como sonda. El vector pRLMex60 se linearizó cortando con *Xba*I. Se utilizaron 10 μ g de DNA genómico de las cepas transformantes y silvestre (wt) para la realización de este análisis.

La presencia del transcrito de la quitinasa es siempre más notable a tiempos largos.

La existencia en el medio de cultivo de altas concentraciones de glucosa o glicerol (2%) reprimía la expresión del gen. El efecto del glicerol sobre la expresión génica en *Trichoderma* spp. resulta controvertido. En determinados casos se ha considerado como una fuente de carbono neutra, por no ejercer un efecto represor sobre los genes de celulasas de *T. reesei* (Ilmén *et al.*, 1996b, 1997). De hecho, se ha conseguido delimitar dentro del promotor del gen *cbh1*, que codifica una celobiohidrolasa, la región responsable de la expresión constitutiva existente en presencia de glicerol (Henrique-Silva *et al.*, 1996). Pero, por otro lado, también se ha descrito como fuente de carbono represora (Carsolio *et al.*, 1994; García *et al.*, 1994; Lora *et al.*, 1995; Rey, 1998, Tesis Doctoral), efecto que se asemeja al observado en *chit33*.

Otro de los sustratos utilizados en el análisis de la expresión de *chit33*, fue la N-acetil- β -D-glucosamina (NAGa), que se obtiene a partir de la hidrólisis de la quitina. Supone una fuente de carbono excelente para el microorganismo, ya que crece vigorosamente en su presencia (Limón, 1999, Tesis Doctoral). Su adición al medio de cultivo reprimía la expresión de *chit33* tanto a 8 como a 24 h.

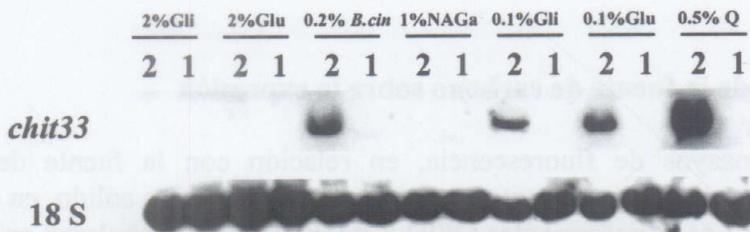


Figura I.9. Efecto de la fuente de carbono y su concentración sobre la expresión de *chit33*. Para la realización de este análisis northern, *T. harzianum* CECT 2413 se precultivó durante 30 h en MM con 2 % de glucosa y; posteriormente se reinoculó en las siguientes condiciones: 2% y 0.1% de glicerol (Gli); 2% y 0.1% de glucosa (Glu); 0.2% de paredes celulares de *B. cinerea* (*B.cin.*); 1% de N-acetil- β -D-glucosamina (NAGa); y 0.5 % de quitina en polvo (Q). Se analizaron dos tiempos de inducción: 1, 8 h y 2, 24 h. Como sonda se utilizó el cDNA completo de *chit33* y, como control de carga el RNA ribosómico (rRNA) 18S de rábano.

4.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA REGULACIÓN EJERCIDA POR *pchit33*

Con anterioridad, se han realizado estudios sobre la regulación de genes implicados en el micoparasitismo usando el marcador *gfp*, demostrándose la utilidad de este sistema para la realización de este tipo de análisis. Dos ejemplos de ello son los estudios realizados con los genes *nag1* y *ech42* de *T. harzianum* P1, que codifican una N-acetil- β -D-glucosaminidasa y una endoquitinasa, respectivamente (Zeilinger *et al.*, 1999).

Respecto a la posible función de CHIT33 en el antagonismo, estudios previos han mostrado que *chit33* se induce en presencia de paredes celulares fúngicas (Limón *et al.*, 1995); este resultado concuerda con el observado a nivel de northern (Fig. I.9). Uno de los objetivos de este trabajo fue concretar cuándo se inducía *chit33* en presencia del fitopatógeno. Para ello, se efectuaron ensayos de confrontación frente a *B. cinerea* y dos cepas de *R. solani*, en los que se analizó la fluorescencia en las distintas etapas de aproximación de los micelios. Estos experimentos permitieron discernir si la expresión de *chit33* era dependiente del contacto de *T. harzianum* con el patógeno, o si era independiente del contacto, como se había descrito para la quitinasa CHIT42, codificada por el gen *ech42* de *T. harzianum* P1 (Zeilinger *et al.*, 1999).

Por otro lado, para corroborar los resultados obtenidos sobre la regulación de *chit33* respecto a la fuente de carbono y a su concentración, se analizó la fluorescencia generada bajo las mismas condiciones de cultivo utilizadas anteriormente (Fig. I.9). La ausencia de autofluorescencia en el micelio de *T. harzianum* CECT 2413, permitió realizar sin dificultad estos experimentos.

4.2.1. Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión

Los ensayos de fluorescencia, en relación con la fuente de carbono y su concentración, se efectuaron tanto en medio líquido como en sólido, en este último caso sobre celofán. Los transformantes GFP3.7 y GFP3.11, se inocularon en medio SM y en medio MM, ambos idóneos para el crecimiento de *Trichoderma* (apartado 2.3.2 de *Materiales y Métodos*). Los resultados obtenidos independientemente a partir de cada transformante, coincidieron bajo las mismas condiciones de cultivo y se muestran en la Figura I.10.

Concentraciones altas de glucosa o glicerol en el medio de cultivo reprimían la expresión de *chit33*. La carencia de fuente de carbono, representada por concentraciones bajas de glucosa o glicerol (0.1%), provocaba la expresión de *chit33*, probablemente por desrepresión génica. La quitina (0.5 %) inducía asimismo la expresión del gen marcador. Estos datos concuerdan con el patrón observado anteriormente (Fig. I.9). Pero, sorprendentemente, se observó una expresión alta de GFP cuando el medio se suplementó con NAGa (0.5 %), contrariamente a lo observado en el análisis northern, donde no se detectaba mRNA de *chit33* (Figura I.9).

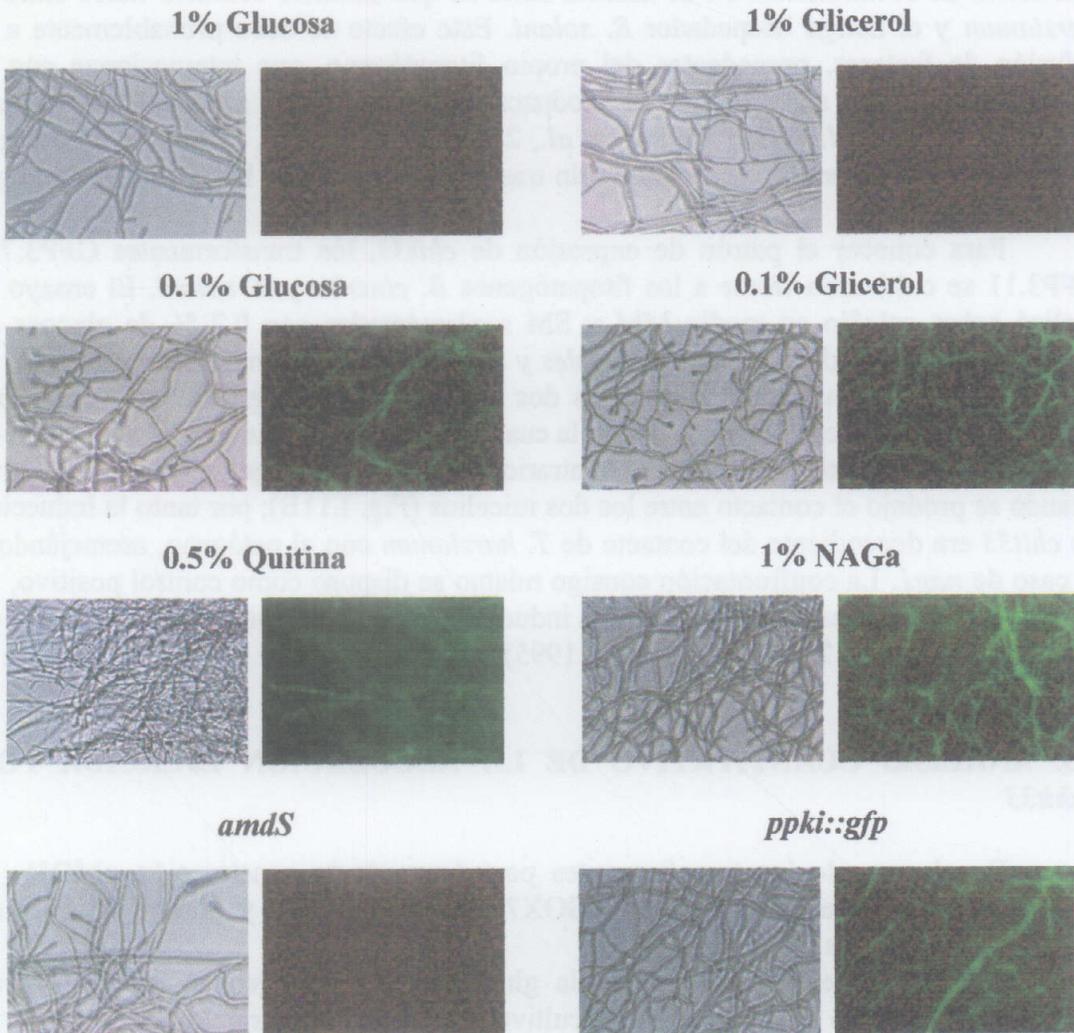


Figura I.10. Efecto de la fuente de carbono sobre la fluorescencia. Las diferentes condiciones de cultivo utilizadas se especifican sobre cada muestra. Como control negativo se utilizó una cepa portadora del vector p3SR2, que contiene el gen *amdS* de *A. nidulans*; como control positivo, un transformante portador de la construcción pZEGA1, que contiene el gen *gfp* bajo la influencia del promotor constitutivo *ppki* (*ppki::gfp*).

4.2.2. Ensayos de confrontación

Como se mencionó anteriormente, en ensayos de confrontación, la expresión del gen *ech42* de *T. harzianum* P1 se inducía antes de que existiera contacto físico entre *T. harzianum* y el hongo hospedador *R. solani*. Este efecto se debe probablemente a la difusión de factores, procedentes del propio fitopatógeno, que interaccionan con el hongo micoparásito antes de que se produzca el contacto entre ambos (Cortés *et al.*, 1998; Zeilinger *et al.*, 1999; Kullnig *et al.*, 2000). Sin embargo, la activación del gen *nag1* en *T. harzianum* P1, se produce sólo tras el contacto con el hospedador (Zeilinger *et al.*, 1999).

Para conocer el patrón de expresión de *chit33*, los transformantes GFP3.7 y GFP3.11 se cultivaron frente a los fitopatógenos *B. cinerea* y *R. solani*. El ensayo se realizó sobre celofán en medio MM y SM suplementados con 0.2 % de glucosa en ambos casos (apartado 2.3.2 de *Materiales y Métodos*). En ausencia de contacto no se detectó fluorescencia en ninguno de los dos transformantes (Figura I.11A); incluso a una distancia tan cercana como 0.5 mm, la cual resultaba suficiente para la activación de *ech42* (Zeilinger *et al.*, 1999). Por el contrario, la expresión del gen marcador se activó cuando se produjo el contacto entre los dos micelios (Fig. I.11B); por tanto la inducción de *chit33* era dependiente del contacto de *T. harzianum* con el patógeno, asemejándose al caso de *nag1*. La confrontación consigo mismo se dispuso como control positivo, ya que previamente se había comprobado la inducción de *chit33* en presencia de paredes de *T. harzianum* CECT 2413 (Limón *et al.*, 1995).

4.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA REGULACIÓN EJERCIDA POR *pchit33*

En el caso de los transformantes portadores de la construcción pMDJ1, se seleccionaron dos de ellos, GOX4 y GOX7, por ser estables y poseer patrones de integración diferentes (Fig. I.8).

El análisis de la expresión de la glucosa oxidasa se realizó en cultivos de *Trichoderma* crecido en los medios de cultivo MM y SM en paralelo, sustituyendo la glucosa por el glicerol. A diferencia de lo que ocurre en otros organismos, en *Trichoderma* no se observa oxidación extracelular de la glucosa (Kubicek-Pranz, 1998), por lo que la actividad observada en los transformantes se debe exclusivamente a la acción del gen marcador. Este sistema permite estudiar la expresión génica a tiempos cortos, debido a su extremada sensibilidad.

4.3.1. Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión

El hecho de que la expresión de *chit33* fuera dependiente del contacto entre *T. harzianum* y el fitopatógeno, sugería que algún componente procedente del hospedador podría actuar como inductor de la expresión de la quitinasa. Esta hipótesis estaba apoyada por la existencia de mRNA de *chit33* en presencia de quitina y de paredes celulares de *B. cinerea* (Fig. I.9) y de *R. solani* (Limón *et al.*, 1995). La fluorescencia observada en los transformantes GFP3.7 y GFP3.11 en presencia de quitina y de uno de los productos obtenidos tras su hidrólisis, la NAGa, apoyaba de igual manera esta idea (Fig. I.10). La activación de la expresión cuando los transformantes GOX4 y GOX7 se cultivaban en presencia de quitina y de NAGa, confirmaba de nuevo los resultados

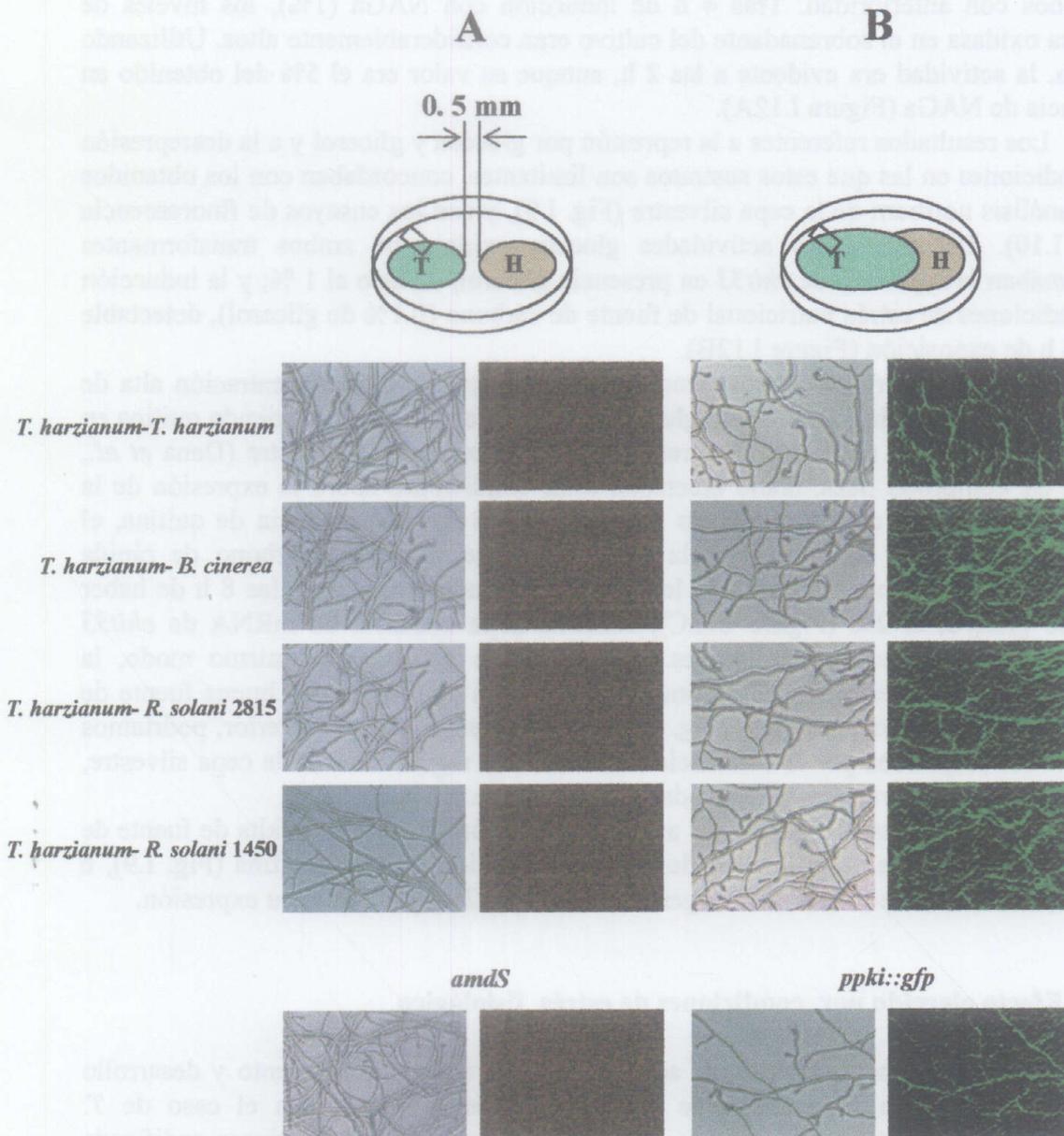


Figura I.11. Ensayos de confrontación. Se realizaron entre *T. harzianum* (T) *ppchit33::gfp* y los patógenos hospedadores (H) *R. solani* 1450, *R. solani* CECT 2815 y *B. cinerea* CECT 2100. La muestra observada al microscopio se tomó de la zona opuesta al frente del crecimiento, señalada en el esquema por un recuadro. Como control negativo se utilizó la cepa portadora del vector p3SR2 (*amdS*) y, como positivo, la portadora de la construcción pZEGA1 (*ppki::gfp*), donde se expresa constitutivamente el gen marcador.

obtenidos con anterioridad. Tras 4 h de inducción con NAGa (1%), los niveles de glucosa oxidasa en el sobrenadante del cultivo eran considerablemente altos. Utilizando quitina, la actividad era evidente a las 2 h, aunque su valor era el 5% del obtenido en presencia de NAGa (Figura I.12A).

Los resultados referentes a la represión por glucosa y glicerol y a la desrepresión en condiciones en las que estos sustratos son limitantes, concordaban con los obtenidos en el análisis northern de la cepa silvestre (Fig. I.9), y con los ensayos de fluorescencia (Fig. I.10). De nuevo, las actividades glucosa oxidasa de ambos transformantes confirmaban la represión de *chit33* en presencia glicerol, incluso al 1 %; y la inducción en condiciones de estrés nutricional de fuente de carbono (0.1% de glicerol), detectable a las 8 h de exposición (Figura I.12B).

Estudios anteriores demostraron que la presencia de una concentración alta de fuente de carbono asimilable, como glucosa o glicerol al 2 %, aun existiendo quitina en el medio de cultivo, reprimía la expresión de *chit33* en la cepa silvestre (Dana *et al.*, 2001). Se comprobó pues, cómo afectaban estas condiciones sobre la expresión de la glucosa oxidasa, en un período corto de inducción (8 h). En presencia de quitina, el sistema se activaba, mientras que la adición de una fuente de carbono de rápida asimilación lo reprimía. La caída de los niveles de glucosa oxidasa a las 8 h de haber añadido glicerol al 2% (Figura I.12C), confirmaba la ausencia de mRNA de *chit33* descrita en esas mismas condiciones. Este resultado apoyaba del mismo modo, la ausencia de RNA mensajero de quitinasa en presencia de NAGa, una buena fuente de carbono para el microorganismo, (Fig. I.9). Al igual que en el caso anterior, podríamos explicar los resultados por la existencia de secuencias reguladoras en la cepa silvestre, ausentes en las construcciones realizadas con el gen *goxA*.

Por tanto, el estrés nutricional afecta la expresión de *chit33*: la falta de fuente de carbono, la presencia de polímeros de difícil asimilación como la quitina (Fig. I.9), e incluso la carencia de fuente de nitrógeno (Dana *et al.*, 2001), inducen su expresión.

4.3.2. Efecto ejercido por condiciones de estrés fisiológico

Las condiciones que resultan adversas para el normal crecimiento y desarrollo del micelio influyen frecuentemente sobre la expresión génica. En el caso de *T. atroviride*, se demostró recientemente que la expresión de la endoquitinasa codificada por el gen *ech42*, se inducía en condiciones de estrés fisiológico, como alta presión osmótica, choque térmico por frío, o presencia de etanol (Mach *et al.*, 1999).

La existencia de un elemento putativo de respuesta a estrés general (5'-CCCCT-3') en la posición -511 y de un elemento de respuesta a choque térmico, en la posición -1342 de la región reguladora de la quitinasa, sugería que la expresión de *chit33* se activa en condiciones desfavorables. Para su verificación, los transformantes portadores de la construcción pMDJ1 se expusieron a condiciones de estrés osmótico, 1M de sorbitol; 2 % de etanol, que interfiere con la integridad de la membrana; metales pesados, como CdSO₄ 3H₂O; y choque térmico, donde incubamos la muestra a 40 °C y a 4°C. Las muestras se tomaron tras 30 y 120 minutos de incubación, tiempo suficiente para provocar una respuesta a estrés en *T. reesei* (Goller *et al.*, 1998a).

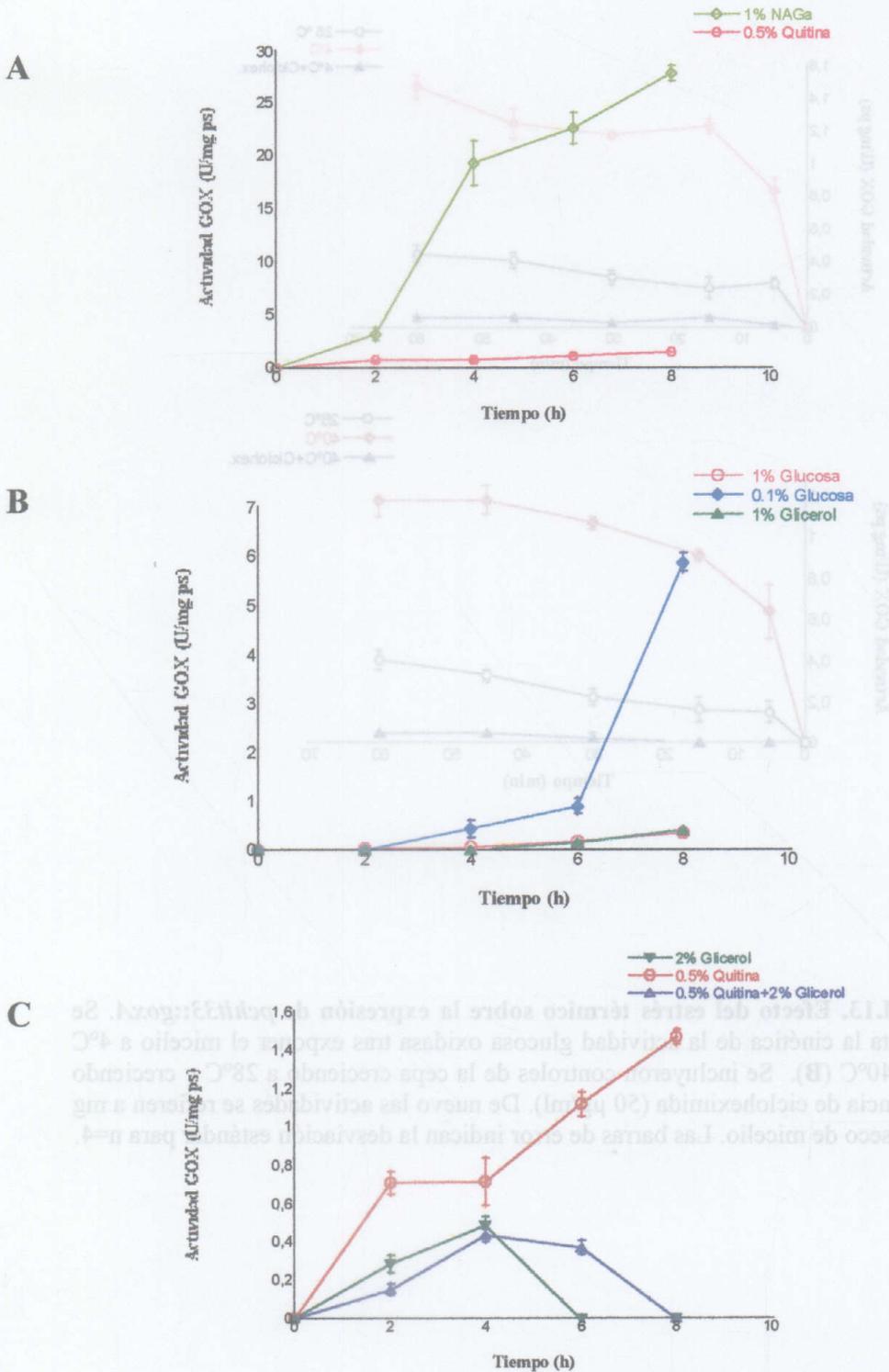
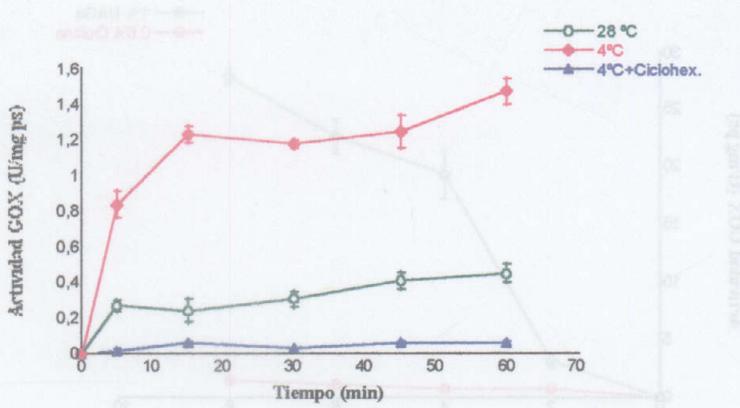


Figura I.12. Efecto de la fuente de carbono y su concentración en la expresión de *pcht33::goxA*. Se representa la cinética de la actividad glucosa oxidasa en medio mínimo con las siguientes fuentes: **A**, 1% de NAGa y 0.5 % de Quitina; **B**, 1% de glucosa, 0.1% de glucosa y 1% de glicerol; **C**, 2% de glicerol, 0.5% de quitina y 0.5% de quitina +2% de glicerol. Las actividades se refirieron a mg de peso seco de micelio. Las barras de error indican la desviación estándar para n=4.

A



B

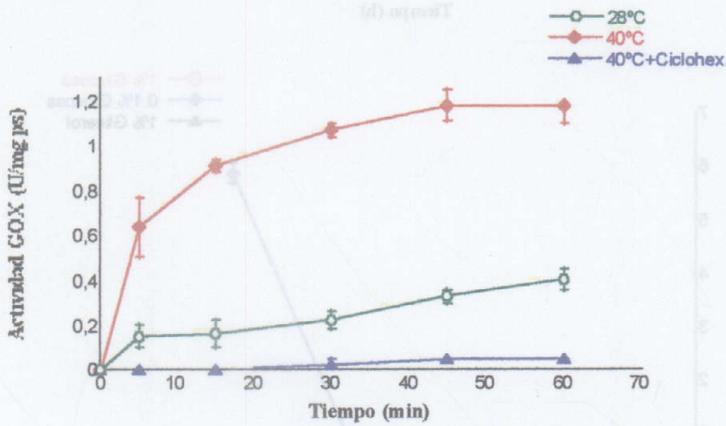


Figura I.13. Efecto del estrés térmico sobre la expresión de *pcht33::goxA*. Se representa la cinética de la actividad glucosa oxidasa tras exponer el micelio a 4°C (A) y a 40°C (B). Se incluyeron controles de la cepa creciendo a 28°C y creciendo en presencia de cicloheximida (50 µg/ml). De nuevo las actividades se refieren a mg de peso seco de micelio. Las barras de error indican la desviación estándar para n=4.

De las condiciones ensayadas, sólo los choques térmicos inducían claramente la expresión de *chit33*. La cinética de inducción demostró que existía una respuesta rápida a tales condiciones, ya que la inducción se detectaba a partir de los 5 primeros minutos de tratamiento (Figura I.13).

El siguiente objetivo consistió en determinar si la actividad enzimática detectada, procedía de proteína que, sintetizada previamente, se almacenaba en el citosol o en la pared celular del hongo; o, si por el contrario, procedía de proteína cuya síntesis se inducía directamente por estrés. Para ello, se realizaron experimentos utilizando cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de actividad glucosa oxidasa en presencia del inhibidor (Figura 12); lo cual demostró que la enzima detectada era sintetizada *de novo* y no procedía de proteína que, almacenada en la célula, se liberaba por efecto del estrés.

Discusión I

La expresión del gen *chit33* se induce, aunque en distinto grado, por la adición de quitina y del monómero que la compone (NAGa), y por estrés de temperatura. La falta de fuente de carbono provoca asimismo su expresión, posiblemente por la desrepresión que a la que se halla sometido el gen en esas circunstancias. Estudios previos han demostrado que algunas de estas condiciones regulan la expresión de los genes *ech42* y *nag1* en *T. atroviride* (Zeilinger *et al.*, 1999), aunque en ninguno de los dos casos, los efectores mencionados modulaban conjuntamente la expresión.

La regulación de *chit33* resulta por tanto compleja, ya que su expresión génica responde a condiciones fisiológicas muy distintas, lo cual apoya el papel asignado a esta quitinasa en *T. harzianum* (Limón *et al.*, 1999).

El gen *chit33* se induce tanto en presencia de paredes celulares fúngicas, como de NAGa. Esto sugiere que el gen está regulado positivamente por los sustratos sobre los que actúa la quitinasa, así como por los productos que se generan al ser hidrolizados. Esto apoya el hecho de que el sistema *chit33::gfp* se exprese sólo durante el contacto de *T. harzianum* con su hospedador y no antes. La expresión de *chit33* por quitina es mayor que la producida por paredes celulares de *B. cinerea*. Probablemente, la hidrólisis de las paredes del fitopatógeno, al ser sustratos más complejos y completos que la quitina, genere algún tipo de componente que influya de algún modo en la expresión génica. Además, la quitina constituye un polímero de difícil acceso por su insolubilidad y su estructura, resultando una mala fuente de carbono para el microorganismo; lo cual podría generar una situación adicional de estrés nutricional severo. Para otros genes de *Trichoderma*, se ha propuesto que la expresión en presencia de quitina se debe más a una desrepresión generada por carencia de fuente de carbono que a una inducción por la presencia del polímero en sí. La ausencia de expresión en condiciones donde se adiciona además de quitina, una fuente de carbono represora en el cultivo, apoya este hecho. Pero por otro lado, el que existan mayores niveles de expresión en presencia de quitina que en condiciones de hambre de carbono, podría plantear la existencia de algún regulador positivo de la expresión génica. Este fenómeno fue descrito con anterioridad en el gen *chi42* de *T. harzianum* (García *et al.*, 1994).

Este es el primer caso en el que se demuestra a nivel molecular en *Trichoderma* la inducción de una quitinasa por quitina, ya que los estudios realizados con el gen *ech42* de *T. atroviride*, mostraron la ausencia de inducción en presencia de este polímero (Margolles-Clark *et al.*, 1996; Mach *et al.* 1999). El tiempo medio requerido para la inducción de *chit33* por quitina, donde la concentración de NAGa es baja, es similar al requerido con este monómero (Fig. I.12C), aunque los niveles de actividad son mayores en este último caso (Fig. I.12A, C). Esto corrobora el hecho de que los niveles de expresión sean proporcionales a los niveles de molécula inductora, presentes en el medio (de la Cruz *et al.*, 1993). Tras un período mayor de incubación, la expresión de *chit33* es más notable (Fig. I.9); lo cual sugiere que la difícil metabolización de la quitina provocaría una tasa lenta de producción de moléculas inductoras. La liberación a dosis pequeñas aunque constantes de inductores, y la probable escasez de moléculas que condujeran a la represión catabólica por fuente de carbono, estarían aseguradas a largo plazo. Por el contrario, la rápida asimilación de la NAGa, contribuiría a una rápida y elevada expresión de enzimas hidrolíticas, que podrían generar productos, que reprimieran la expresión de *chit33*.

Si esta hipótesis fuera correcta, sería interesante estudiar la existencia de N-acetilglucosaminidasas en *T. harzianum* CECT 2413, y su posible inducción por quitina. El gen *nag1* de *T. atroviride*, que codifica una N-acetilglucosaminidasa, se induce por NAGa (Mach *et al.*, 1999) y su cinética de inducción es prácticamente idéntica a la de *chit33*.

La fuerte expresión hallada en los genes marcadores cuando el micelio crece en presencia de NAGa, a diferencia de lo que ocurre en la cepa silvestre, podría explicarse asimismo por la existencia de regiones reguladoras en el gen nativo, que no están presentes en las construcciones realizadas con los genes *goxA* y *gfp*. En numerosos casos se ha podido comprobar la presencia de regiones reguladoras en las zonas 5' y 3' no codificantes, así como en intrones (Le Hir *et al.*, 2003).

La expresión de *chit33* se activa además en ausencia de fuente de carbono y se reprime en presencia de altas concentraciones de glucosa o glicerol. Esta respuesta podría relacionarse con una desrepresión/represión por fuente de carbono. Sin embargo la presencia de un solo motivo putativo de unión a CreA/Cre1, no coincide con los motivos funcionales identificados *in vitro*, que constan de dos copias de la región consenso, organizadas como repeticiones directas o invertidas (Cubero & Scazzocchio, 1994; Mach *et al.*, 1996; Ilmén *et al.*, 1996a).

La represión de *chit33* en presencia de glicerol, difiere asimismo de los resultados obtenidos con determinados genes de *T. reesei*, ya que es considerado como una fuente de carbono neutra (Ilmén *et al.*, 1996b), aunque concuerda con el efecto ejercido sobre otros genes de *Trichoderma* (Carsolio *et al.*, 1994; García *et al.*, 1994; Lora *et al.*, 1995; Rey, 1998, Tesis Doctoral). Este resultado descarta que el factor Cre1 sea la única molécula represora del sistema y, por tanto, sugiere la existencia de sistemas represores adicionales a éste. Para el gen *ech42* de *T. atroviride*, se ha descrito una respuesta similar frente a glucosa y glicerol, lo que sugiere la existencia de un mecanismo general relacionado con la síntesis de quitinasas y de otras proteínas en hongos (Mach *et al.*, 1999; Rey, 1998, Tesis Doctoral).

Los datos revelan, por otro lado, una inducción rápida de *chit33* cuando el micelio se somete a altas o bajas temperaturas, 40°C y 4°C respectivamente; aunque los niveles de expresión son menores que los observados en las otras condiciones de inducción mencionadas anteriormente. El uso de cicloheximida permite afirmar que la proteína detectada en situaciones de estrés, se sintetiza *de novo* y no se libera a partir de algún compartimento celular tras el daño fisiológico causado. La baja expresión detectada en el control, podría corresponder a una expresión basal constitutiva del gen. Trabajos previos han descrito la expresión de niveles basales de enzimas en *Trichoderma*, incluso en condiciones represoras (Gritzali & Brown, 1979; Mandels *et al.*, 1962). Estos niveles basales de enzima contribuirían a la hidrólisis inicial del sustrato, dando lugar a la liberación de productos inductores del sistema (El-Gogary *et al.*, 1989; Henrique-Silva *et al.*, 1996).

El gen *ech42* de *T. atroviride*, se induce levemente tras incubar el micelio a 4°C (Mach *et al.*, 1999), lo que sugiere que quizás no sea un fenómeno del todo inusual. La respuesta al choque por bajas temperaturas ocurre en procariotas y en eucariotas (Phadtare *et al.*, 1999), aunque hasta el momento no se ha descrito la inducción de quitinasas de origen fúngico o bacteriano. Se podría intuir que la inducción de enzimas implicadas en mecanismos de defensa, entre otros, conferiría ventajas al microorganismo para su permanencia en el medio natural. De hecho, la especie *T. harzianum* fue aislada, por Gams & Meyer (1998), en la misma zona donde se había aislado 30 años antes, tras haber estado sometida a temperaturas anuales restrictivas para su crecimiento. La resistencia a bajas temperaturas es un carácter de gran interés, ya que permitiría conseguir cepas de *Trichoderma* con mayor capacidad de colonización y, por tanto, de utilidad más extensa en el control biológico.

Capítulo II

Análisis funcional de la expresión heteróloga de las quitinasas CHIT33 y CHIT42, de *T. harzianum*, en plantas de tabaco

Introducción II

1. LOS MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

El carácter sésil de la mayoría de las plantas obliga a que éstas cuenten con avanzados mecanismos de defensa que les permitan sobrevivir a condiciones ambientales adversas; las cuales ejercen una presión selectiva sobre ellas. Estos mecanismos pueden ser **constitutivos**, que comprenden barreras generales o defensas bioquímicas preexistentes; o bien pueden ser **inducibles**, que incluyen el reconocimiento del daño en la planta, la transducción de señales y la expresión génica correspondientes (García-Olmedo *et al.*, 2001; Mittler, 2002; Singh *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2002).

Cuando se inducen estos mecanismos, la respuesta puede ser **local** o **sistémica**. La respuesta local ocurre en los tejidos vegetales al reaccionar frente a un determinado patógeno y se da mediante un tipo de muerte celular programada, conocida como **respuesta hipersensible o HR**, que conduce a una pérdida de electrolitos en el citoplasma, a la generación de formas oxidativas y a la expresión génica. Por el contrario, la respuesta sistémica comprende un conjunto de señales que se propagan desde el lugar del daño a toda la planta; y puede originarse por estrés abiótico o biótico (productos químicos, insectos, microorganismos, daño mecánico, etc.).

En la respuesta sistémica la señal se expande gracias a moléculas mensajeras como el ácido salicílico, el jasmónico, el óxido nítrico y el etileno (Klessig *et al.*, 2000). Se denomina **respuesta sistémica inducida o ISR** cuando surge de la interacción de la planta con microorganismos simbióticos o avirulentos (Sandermann, 2000). La **respuesta sistémica adquirida o SAR** hace referencia a la inducción de los mecanismos de defensa en localizaciones remotas al origen donde ha ocurrido la herida o infección, y cuyo fin es preparar a la planta para la defensa ante nuevos ataques producidos por patógenos (Sticher *et al.*, 1997). El ácido jasmónico y el etileno son las moléculas transmisoras propuestas en la ISR; para el caso de la SAR, la molécula considerada es el ácido salicílico o SA. Recientemente se ha comprobado que existen interacciones que regulan y coordinan de forma común rutas que consideradas antagónicas, como son las del jasmonato y el salicilato (Maleck & Dietrich, 1999; Schenk *et al.*, 2000).

A grosso modo, se podría decir que en respuesta a un estrés general, ya sea de tipo biótico o abiótico (Apartados 2 y 3 de esta introducción), se produce una señal que desemboca en la formación de moléculas conocidas como **segundos mensajeros**. Estos mensajeros pueden modular los niveles intracelulares de calcio (Ca^{2+}), iniciándose una cascada de fosforilación de proteínas, que finalmente tienen como diana a otras implicadas en la protección celular, o a factores de transcripción que modulan la expresión de genes regulados por estrés (Petersen *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2002; Zhang & Klessig, 2001). Los productos de estos genes pueden participar en la generación de moléculas reguladoras, como el ácido abscísico (ABA), el etileno y el ácido salicílico (SA), entre otras; las cuales pueden iniciar una segunda ronda de señalización (Ellis & Turner; 2001; Klessig *et al.*, 2000; Ridley *et al.*, 2001; Zhao & Chye, 1999).

Las señales secundarias, como hormonas y segundos mensajeros, inician por tanto, otra cascada de señalización que se diferencia de la primera por estar desplazada en el tiempo y en el espacio, ya que las señales pueden difundir intra o intercelularmente y, sus receptores, pueden estar en distintas localizaciones subcelulares. Las señales secundarias pueden diferir asimismo en la especificidad con respecto a la de los estímulos iniciales, pudiendo ser compartidas por diferentes rutas de respuesta a distintos tipos de estrés. Este hecho puede conferir una protección cruzada frente a

varios daños (Singh *et al.*, 2002). La transducción de señales requiere, por tanto, una coordinación espacio-temporal de todas las moléculas implicadas en señalización. En los apartados sucesivos se detalla la implicación en estos procesos de moléculas como la hormona ABA, el SA, el etileno, el jasmónico, el óxido nítrico (NO) y las formas reactivas del oxígeno o formas ROS.

Dentro de los mensajeros intracelulares destaca por un lado el Ca^{2+} , cuyo flujo viene desde el apoplasto o bien desde almacenes internos en la célula y, por otro lado, el fosfatidil-inositol-difosfato (PIP_2). En este último caso, es la propia membrana celular la precursora de segundos mensajeros. A partir del PIP_2 se sintetiza diacil-glicerol e inositol trifosfato (IP_3), que provocan la liberación de Ca^{2+} intracelular.

La activación de los mecanismos de defensa y de respuesta en la planta requiere, en determinados casos, de la presencia de una molécula activadora o elicitor (revisado por Ebbel, 1998; Ito *et al.*, 1997). Los elicitores derivan o bien del patógeno o del propio tejido vegetal y pueden poseer distinta naturaleza, como se describe en el apartado 3 de esta introducción.

2. DAÑO GENERADO POR EL ESTRÉS EN LAS PLANTAS

El estrés, tanto biótico como abiótico, es responsable de grandes pérdidas en la producción agrícola del mundo. La respuesta al estrés en las plantas está regulada por múltiples rutas de señalización, las cuales en algunos casos solapan entre sí y comparten determinados patrones de expresión génica, lo que puede desencadenar una respuesta común frente a daños de diferente naturaleza (Maleck & Dietrich, 1999; Singh *et al.*, 2002).

Dentro de las rutas de transducción de señales eucariotas, la estructura y la función de las MAP (Mitotic Activated Proteins) kinasas, están ampliamente conservadas (Petersen *et al.*, 2000). Numerosos estudios detallan la activación de estas kinasas por condiciones de estrés diferentes: infección por patógeno, cambios de temperatura, herida, sequía, salinidad, estrés osmótico, radiación ultravioleta y estrés oxidativo (Zhang & Klessig, 2001; Zhang & Liu, 2001).

A continuación se detallan las características principales de cada tipo de estrés y los mecanismos de defensa frente a ellos que existen en las plantas.

2.1. EL ESTRÉS BIÓTICO

Las enfermedades producidas por los fitopatógenos en las plantas, causan pérdidas en la agricultura mundial en torno al 13% de la producción total. Las enfermedades conocidas hasta el momento, aproximadamente 11000, son producidas por 120 géneros distintos de hongos, 30 virus distintos y 8 géneros de bacterias (Montesinos *et al.*, 2002).

Las condiciones para que se desarrolle una enfermedad se dan en la naturaleza con baja frecuencia, ya que debe coincidir por una parte el ciclo de vida del patógeno y por otra, el estado de la planta, que influye en la respuesta generada. Por otro lado, el patógeno cuenta con respuestas que contribuyen a bloquear los mecanismos de defensa de las plantas e incluso de los ejercidos por los microorganismos antagonistas del medio. Entre estas respuestas incluimos la detoxificación, la represión de genes implicados en el biocontrol, el flujo activo de antibióticos y la resistencia frente a éstos (Duffy *et al.*, 2003).

Las plantas se encuentran en constante interacción con organismos del medio. El hecho de que sólo en determinadas ocasiones se desarrolle la enfermedad se explica gracias a la hipótesis gen a gen (Bonas & Lahaye, 2002), desarrollada a continuación.

2.1.1. El reconocimiento entre la planta y el patógeno: Hipótesis gen a gen

Esta hipótesis se basa en la interacción entre el producto de un **gen *Avr*** o gen de avirulencia, perteneciente al fitopatógeno, y el producto de un gen de resistencia o **gen *R***, perteneciente a la planta hospedadora (Bonas & Lahaye, 2002). Según este modelo un elicitor específico, producto putativo de un gen *Avr*, es reconocido por un receptor, producto putativo de un gen *R* de la planta. Si la combinación que existe entre ambos es complementaria, se genera una **interacción incompatible** que activaría una ruta de transducción de señales que conduciría a la resistencia activa por parte del hospedador, la cual implica con frecuencia la denominada **respuesta hipersensible (HR)**. Si, por el contrario, la combinación entre ambos productos no es complementaria, se produce una **interacción compatible**, la cual desemboca en una infección de la planta por parte del patógeno. Un esquema de esta hipótesis se detalla en la Figura II.1.

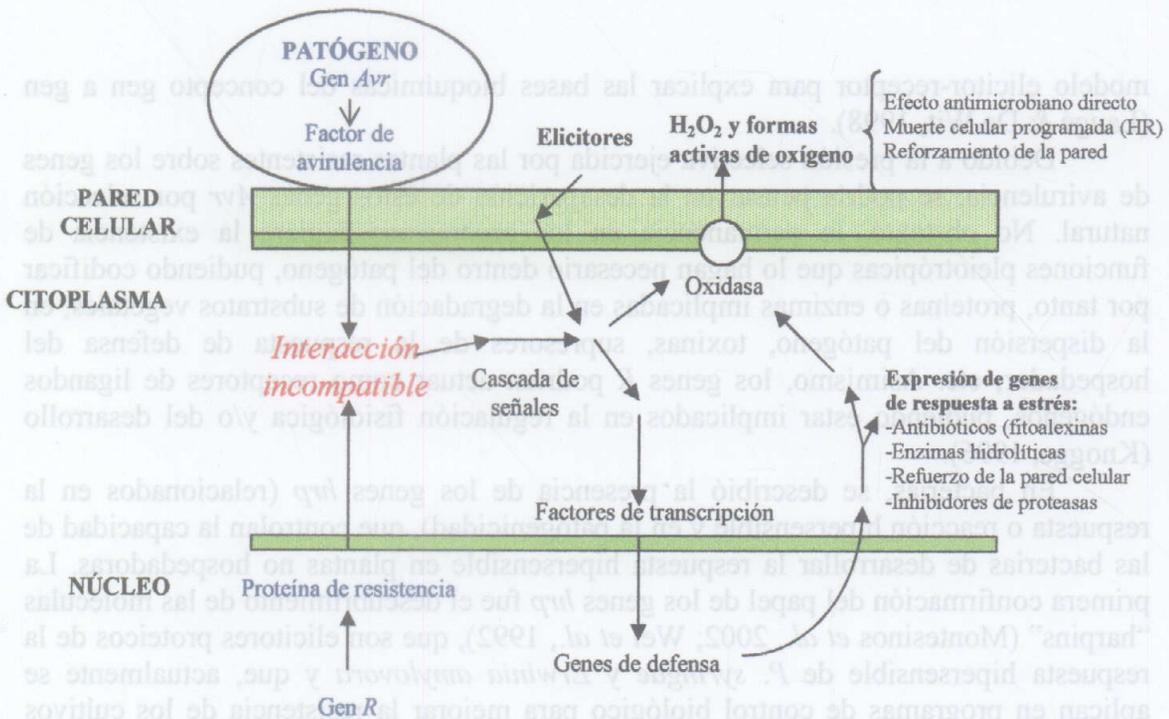


Figura II.1. Esquema de los mecanismos de defensa de la planta en una interacción incompatible

Según los casos estudiados en la naturaleza, la virulencia parece ser un carácter recesivo y la avirulencia dominante (Tabla II.1). Se ha propuesto la existencia de un

Genotipo del patógeno	Genotipo del hospedador	
	<i>R1-r2r2</i>	<i>r1r1R2-</i>
Haploide		
<i>A1a2</i>	Incompatible	Compatible
<i>a1A2</i>	Compatible	Incompatible
Diploide/dicariótico		
<i>A1-a2a2</i>	Incompatible	Compatible
<i>a1a1A2-</i>	Compatible	Incompatible

Tabla II.1. La hipótesis gen a gen considerando dos parejas de genes *Avr/R*

modelo elicitor-receptor para explicar las bases bioquímicas del concepto gen a gen (Laugé & De Wit, 1998).

Debido a la presión selectiva ejercida por las plantas resistentes sobre los genes de avirulencia, se podría pensar en la desaparición de estos genes *Avr* por selección natural. No obstante, la permanencia en los organismos sugiere la existencia de funciones pleiotrópicas que lo hagan necesario dentro del patógeno, pudiendo codificar por tanto, proteínas o enzimas implicadas en la degradación de sustratos vegetales, en la dispersión del patógeno, toxinas, supresores de la respuesta de defensa del hospedador, etc. Asimismo, los genes *R* podrían actuar como receptores de ligandos endógenos, pudiendo estar implicados en la regulación fisiológica y/o del desarrollo (Knogge, 1996).

En bacterias, se describió la presencia de los genes *hrp* (relacionados en la respuesta o reacción hipersensible y en la patogenicidad), que controlan la capacidad de las bacterias de desarrollar la respuesta hipersensible en plantas no hospedadoras. La primera confirmación del papel de los genes *hrp* fue el descubrimiento de las moléculas “harpins” (Montesinos *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 1992), que son elicitores proteicos de la respuesta hipersensible de *P. syringae* y *Erwinia amylovora* y que, actualmente se aplican en programas de control biológico para mejorar la resistencia de los cultivos ante los fitopatógenos (Messenger[®], EDEN Bioscience[®], E.E.U.U.).

En los virus, los genes de avirulencia suelen corresponder a proteínas de la cápsida o implicadas en su dispersión. En hongos fitopatógenos, los genes *Avr* clonados codifican proteínas de función variada, como se detalla en la Tabla II.2. (Bonas & Lahaye, 2002; Laugé & De Wit, 1998).

Patógeno	Gen de avirulencia (<i>Avr</i>)	Especificidad	Homología
<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Avr9</i>	Tomate/genotipo <i>Cf-9</i>	Péptido rico en cisteínas
	<i>Avr4</i>	Tomate/genotipo <i>Cf-4</i>	Ninguna
	<i>Ecp2</i>	Tomate/genotipos <i>Cf-ECP2</i>	Ninguna
<i>Rhynchosporium secalis</i>	<i>nip1</i>	Cebada/genotipo <i>Rrs1</i>	Toxina/Hidrofobina?
<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>AVR2-YAMO</i>	Arroz/cultivar Yashiro-mochi	Proteasa neutra de Zn ²⁺
<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>para1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> ?	Ninguna
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>inf1</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Ninguna

Tabla II.2. Genes *Avr* de origen fúngico (basado en Laugé & De Wit, 1998)

A diferencia de los genes de avirulencia, los genes *R* codifican en su mayoría proteínas relacionadas estructuralmente con receptores que contienen motivos o repeticiones ricos en leucina (motivos LRR), extracelulares o intracelulares. Las proteínas *R* con el dominio LRR intracelular presentan un dominio putativo de unión a nucleótido o dominio NB. Estas proteínas reconocen la señal procedente del patógeno e intervienen en la activación de los mecanismos de defensa de las plantas (Bonas & Lahaye, 2002).

2.1.2. Los mecanismos de defensa frente al estrés biótico

2.1.2.1. La respuesta hipersensible (HR)

La respuesta hipersensible o HR ocurre cuando la interacción entre la planta y el patógeno es incompatible (Bonas & Lahaye, 2002). En este proceso se activa un programa de muerte celular en el que intervienen formas activas que derivan del oxígeno, o formas ROS. El programa celular de la HR es distinto al que ocurre en la senescencia, aunque recientemente se ha podido comprobar que contienen algunos marcadores comunes, por lo que probablemente exista conexión entre ambos (Pontier *et al.*, 1999; Tronchet *et al.*, 2001). Las células que mueren por la HR, parecen liberar una señal a las células vecinas que induce senescencia en éstas, por lo que contribuye a la formación de una segunda barrera para la propagación del patógeno (Pontier *et al.*, 1999).

La HR se asemeja a la muerte celular programada que ocurre en células animales (del Pozo & Lamb, 1998). En la respuesta hipersensible también se ha visto que intervienen MAP kinasas; en concreto la HR se caracteriza por la prolongada activación de una kinasa dependiente de salicílico (SIPK) y una activación desplazada en el tiempo con respecto a la SIPK, de la kinasa WIPK (wound induced protein kinase), que se activa asimismo por herida (Droillard *et al.*, 2000; Hoyos & Zhang, 2000; Mikolajczyk *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998; ; Zhang *et al.*, 2000; Zhang & Liu, 2001; Zhang & Klessig, 2001; Zhu, 2001). La inhibición de ambas kinasas suprime la muerte celular

existente en la HR, por tanto son necesarias para que se desarrolle correctamente el programa celular (Petersen *et al.*, 2000).

Durante la respuesta hipersensible se generan señales endógenas que regulan la expresión de los genes de defensa. Como se mencionó anteriormente, en la HR el ácido salicílico juega un importante papel como señal endógena que media la regulación de los genes de defensa (Klessig *et al.*, 2000). Por otro lado está implicado en el aumento de la producción de formas ROS que ocurre en la HR, ya que el ácido salicílico inhibe la enzima catalasa, que es una de las principales fuentes detoxificadoras de las formas reactivas del oxígeno (Bi *et al.*, 1995; Durner & Klessig, 1995; Mittler *et al.*, 1999; Mittler, 2002; Takahashi *et al.*, 1997).

Las células vegetales que sufren HR, incrementan su la fluorescencia al microscopio (Figura II.2), debido fundamentalmente a la producción y liberación de compuestos fenólicos tras la muerte celular (Alamillo & García-Olmedo, 2001).



Figura II.2. Fluorescencia característica de la HR. Como muestra se utiliza una hoja de tabaco donde se ha inoculado *P. syringae* pv *tabaci*. Tras 24 h, se percibe necrosis en la zona del inóculo, donde se da lugar a la Respuesta Hipersensible (HR). La autofluorescencia se estimula tras exponer la muestra a luz ultravioleta en el microscopio.

2.1.2.2. Formas activas de oxígeno o formas ROS. El daño tóxico

Las formas activas de oxígeno, radicales libres de oxígeno o formas ROS se producen a partir de la reducción del oxígeno molecular, al aceptar electrones de otras moléculas. Normalmente se generan cuando el metabolismo de las mitocondrias y los cloroplastos se halla alterado, y son una consecuencia común del estrés biótico y abiótico (Polle & Renneberg, 1993; Venisse *et al.*, 2001).

La sucesiva reducción del O_2 al H_2O genera los intermediarios $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} y H_2O_2 ; que son potencialmente tóxicos y reactivos respecto al oxígeno. Estas especies activas oxidan inespecíficamente proteínas y lípidos de membrana, y pueden causar daño en el DNA (Briat & Lebrun, 1999; Schützendübel & Polle, 2002). Además se les ha atribuido un papel antimicrobiano, aunque algunos estudios no las implican directamente en este proceso (Miguel *et al.*, 2000).

Numerosos aminoácidos son susceptibles de ser modificados por las formas ROS; entre ellos la histidina, la lisina, la arginina, la prolina, la cisteína y la metionina. Las proteínas dañadas son sustratos idóneos de las proteasas (Davies *et al.*, 1987).

El daño genotóxico implica fundamentalmente modificaciones en las bases, rotura en las cadenas de DNA y entrecruzamiento o “cross-linking” intra e intermolecular entre las proteínas y el DNA. Los radicales libres producidos, próximos al DNA, pueden añadir o eliminar átomos de hidrógeno a las bases o a los enlaces, respectivamente, pudiendo darse de 10^4 - 10^5 modificaciones por célula y día (Briat & Lebrun, 1999).

Tradicionalmente las formas ROS se han considerado formas tóxicas derivadas del metabolismo aeróbico. Estudios posteriores han demostrado que las plantas las sintetizan asimismo como moléculas de señalización que intervienen en la respuesta hipersensible, en las respuestas frente al estrés abiótico, en la defensa frente a los patógenos y en la señalización sistémica (Mittler, 2002; Chamnongpol *et al.*, 1998). Por tanto, se han estudiado como factores implicados en los mecanismos de defensa de las plantas (Bolwell *et al.*, 2002; Sandermann, 2000), como señales intermediarias en la regulación de la expresión génica (Vranova *et al.*, 2002), como moléculas de señalización (Neill *et al.*, 2002), e incluso en determinados estados del desarrollo, como sustratos en los procesos de lignificación y “cross-linking” de la pared celular (Fath *et al.*, 2002).

La célula, en estado normal, contiene una concentración de peróxido de hidrógeno en el cloroplasto en torno a $0.5 \mu\text{M}$, mientras que en estado estresado la concentración ronda entre 5 - $15 \mu\text{M}$ (Schützendübel & Polle, 2002). Los niveles de las formas ROS se regulan mediante los sistemas antioxidativos, compuestos por metabolitos como el glutatión (GSH) y el ascorbato; y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las peroxidasa.

El balance entre estos tres tipos de enzimas es crucial para que se mantengan los niveles mínimos de ROS necesarios en la señalización y para que se eliminen los excesos de estas formas en caso de estrés. Según la enzima considerada, la afinidad por las formas ROS es distinta, así pues, la CAT presenta una afinidad de orden mM, mientras que la APX de orden μM . Esto sugiere que la APX pueda estar implicada en mantener los niveles basales de las formas ROS, mientras que la CAT en los procesos de detoxificación en casos de estrés (Mittler, 2002).

La eliminación de las formas ROS se llevan a cabo por la SOD y la APX en el cloroplasto; por el ciclo ascorbato-glutatión, que ocurre en el cloroplasto, la mitocondria, el citosol, el apoplasto y el peroxisoma; el ciclo glutatión-peroxidasa y mediante la CAT en los peroxisomas (Mittler 2002).

Las formas ROS se producen en dos fases: **Fase I**, donde se da una producción transitoria por un estímulo inespecífico y ocurre por patógenos compatibles e incompatibles con la planta, lo que supone una primera barrera inespecífica; y **Fase II**, retrasada con respecto a la I de 1 a 3 horas, siendo de mayor duración (Bolwell *et al.*, 2002; Hüchelhoven & Kogel, 2003; Venisse *et al.*, 2001). La Fase II se genera tras una interacción incompatible entre la planta y el patógeno y es característica de la respuesta hipersensible. El exceso de H_2O_2 producido durante esta respuesta difunde entre las células junto con el ácido salicílico y el NO activando los mecanismos de defensa de la planta, entre los que se halla la muerte celular programada.

Durante esta respuesta, el ácido salicílico y el NO suprimen la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa y catalasa, como se mencionó en el apartado anterior de esta introducción, por lo que la célula acumula un exceso de formas ROS. Sin embargo, el ácido salicílico no inhibe a un tipo de peroxidasa asociada a la pared celular,

denominada guayacol peroxidasas o peroxidasas aniónicas; que interviene en la síntesis y en el entrecruzamiento o “cross-linking” de los componentes de la pared (Durner y Klessig, 1995). Por tanto, mientras se amplifica la señalización para la activación de los genes de defensa, se contribuye al reforzamiento de la pared celular, generándose una barrera física para la entrada y propagación del patógeno.

2.1.2.3. Engrosamiento de la pared celular

Una de las estrategias utilizadas por las plantas frente a un ataque por patógeno es la lignificación y la suberización de la pared celular (McLusky *et al.*, 1999; Mohan *et al.*, 1993). Como la lignina, la suberina está constituida por un polímero aromático que se halla anclado covalentemente a los carbohidratos y/o proteínas de la pared celular. La deposición de ambos polímeros toma lugar durante días tras darse la herida o la infección (revisado por Hammond-Kosack & Jones, 1996). En respuesta al ataque por parte de un patógeno, las peroxidasas aniónicas usan el H₂O₂ como sustrato para la formación de los radicales necesarios en la formación de la lignina y suberina.

Por otro lado, las formas ROS intervienen en la inmovilización y el anclaje de las proteínas a la pared celular (Hückelhoven & Kogel, 2003).

Ambos hechos contribuyen al reforzamiento de la pared de la célula vegetal y por tanto de la barrera física que ésta supone para la entrada del patógeno.

2.1.2.4. Síntesis de compuestos antimicrobianos

Los segundos mensajeros producidos en respuesta a un patógeno interactúan con proteínas específicas que pueden estar implicadas en la activación transcripcional de genes, muchos de los cuales codifican enzimas implicadas en el metabolismo secundario de la planta y, específicamente, en la síntesis de compuestos fenólicos. Una de las enzimas activadas es la PAL (fenil amonio liasa), que interviene en la síntesis de compuestos antimicrobianos, como son las fitoalexinas (Maleck & Dietrich, 1999).

Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular, lipofílicos que se acumulan rápidamente alrededor de los sitios de infección, y en respuesta a una gran variedad de elicitores (revisado por Hammond-Kosack & Jones, 1996).

La síntesis de las fitoalexinas y de los compuestos fenólicos está inducida por patógeno; pero por otro lado, la planta cuenta con compuestos antimicrobianos cuya síntesis es constitutiva, como las saponinas, los glucósidos cianogénicos y los glucosinatos (García-Olmedo *et al.*, 1998; Osbourn, 1996a, 1996b).

2.1.2.5. Activación génica. Síntesis de proteínas de respuesta a patógeno (PR)

El objetivo de la ruta de transducción de señales es la activación de genes que intervienen en la defensa frente al patógeno. Las proteínas PR (Pathogenesis Related) engloban a un conjunto de proteínas intra y extracelulares que se acumulan en los tejidos vegetales tras someter la planta a un estrés (Buchel *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Zhao & Chye, 1999). Estudios realizados demuestran que se inducen en las interacciones compatibles e incompatibles entre la planta y el patógeno, siendo la acumulación mayor y más rápida en el último caso (Jia & Martin, 1999).

Aunque es un grupo heterogéneo de proteínas, pues incluyen glucanasas, quitinasas y peroxidasas, entre otras, poseen características comunes, como gran estabilidad a bajo pH, resistencia moderada a la proteólisis y bajo peso molecular

(Stintzi, 1993). En algunos casos se ha demostrado que tienen propiedades antifúngicas *in vitro* (Niderman *et al.*, 1995).

Las proteínas PR constituyen marcadores moleculares de la denominada respuesta sistémica adquirida o SAR (apartado 1 y 2.1.2.6. de esta introducción), aunque los patrones puedan variar entre distintas especies. En *Arabidopsis*, la SAR incluye las proteínas PR-1 (de función desconocida), PR-2 (β -1,3-glucanasa) y PR-5 (proteína del tipo taumatina); siendo la PR-1 el marcador más usado por la intensidad de su expresión. En *Nicotiana* sp, algunos de los genes que codifican PRs son miembros de una pequeña familia génica que codifica isoformas ácidas y básicas y que responden específica y diferencialmente a segundos mensajeros (Maleck & Dietrich, 1999).

Recientemente se ha estudiado en detalle los elementos reguladores de los genes de las proteínas PR, entre los que se han identificado los elementos de respuesta a etileno (ERE o caja GCC) y a ácido salicílico, entre otros (Lebel *et al.*, 1998; revisado por Kizis *et al.*, 2001; Rushton & Somssich, 1998; Singh *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2001).

2.1.2.6. La respuesta sistémica adquirida o SAR

Como se mencionó anteriormente, en el apartado 1 de esta introducción, la respuesta hipersensible desemboca en la respuesta sistémica adquirida o SAR. Se puede decir que la SAR constituye la inducción de los mecanismos de defensa en sitios distantes del origen donde se ha producido la infección y que su fin es preparar a la planta para defenderse contra nuevos ataques por patógenos, aunque recientemente se ha comprobado que se activan de igual forma mecanismos de defensa específicos de otros tipos de estrés (Montesinos *et al.*, 2002).

2.1.3. Las quitinasas vegetales

Entre las proteínas PR se encuentran las quitinasas (apartado 2.1.2.5). La actividad quitinasa aumenta en las plantas tras la infección, lo que sugiere que puedan intervenir en la protección frente a patógenos fúngicos mayoritariamente (Kasprzewska, 2003; Büchter *et al.*, 1997).

Las plantas contienen múltiples formas de quitinasas, las cuales se han clasificado en varios grupos o clases (Figura II.3), atendiendo a sus características estructurales y funcionales (Collinge *et al.*, 1993):

Clase I: Normalmente son proteínas básicas y se localizan en la vacuola. Contienen un extremo amino terminal rico en glicina, que tiene la capacidad de unirse a la quitina. Este dominio se halla unido al dominio catalítico o carboxilo terminal por medio de una región rica en prolina, que contiene la información necesaria para dirigir la proteína a la vacuola.

Clase II: Comparten un 60% de identidad con las de clase I. Suelen ser proteínas ácidas extracelulares que carecen del dominio de unión a la quitina y del péptido señal de la región carboxilo terminal específico de vacuola.

Clase III: Son proteínas extracelulares que carecen de homología con las de clase I y II, por lo que fueron agrupadas en otro grupo de proteínas PR.

Clase IV: Se asemejan a las de clase I por poseer un dominio rico en cisteínas, aunque son proteínas de menor tamaño.

Clase V: Este grupo está representado por dos proteínas de tabaco que poseen una baja homología con el resto de las quitinasas vegetales, pero que presentan cierta homología con exoquitinasas bacterianas.

Clase VI: Son estructuralmente similares a las de tipo IV y presentan una homología significativa con las quitinasas bacterianas.

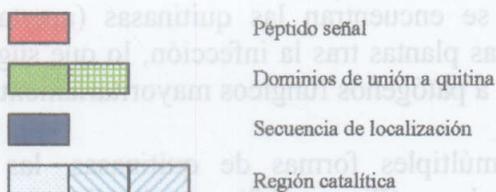


Figura II.3. Estructura de las quitinasas de plantas

La mayoría de las quitinasas caracterizadas hasta la fecha, incluyen miembros de todas las clases anteriormente mencionadas. Su inducción responde a infección o a estrés de tipo biótico o abiótico, y a fitohormonas como el etileno, el ácido jasmónico y el ácido salicílico. Sólo algunas de ellas poseen actividad antifúngica *in vitro*, lo que sugiere que estas enzimas realizan funciones adicionales a la de defensa (Tabla II.3).

Las quitinasas se sintetizan asimismo en determinados tejidos y órganos de plantas no estresadas, durante etapas concretas del desarrollo (Kasprzewska, 2003). Así, se han identificado quitinasas específicas que se expresan constitutivamente en flores y células epidérmicas (Bütcher *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1994; Harikrishna *et al.*, 1996;

Neale *et al.*, 1990). Se ha descrito que las quitinasas que intervienen en el desarrollo y el crecimiento, lo hacen mediante la generación o degradación de moléculas señal, o formando parte de la muerte celular programada (Kasprzewska, 2003).

En monocotiledóneas se ha podido comprobar que las quitinasas intervienen en procesos de resistencia al frío, al unirse a la superficie de los cristales de hielo e impedir su expansión. Esta propiedad también se ha atribuido a enzimas como las β -1,3-glucanasas y proteínas del tipo de la taumatina (Yeh *et al.*, 2000).

Las quitinasas, asimismo, pueden constituir proteínas de reserva que sirvan como fuente de aminoácidos para la síntesis de otras proteínas durante la maduración del fruto (Peumans *et al.*, 2002).

Función/proceso en el que intervienen	Tipo de quitinasa	Especie vegetal
patogénesis	intracelular, clase IV básica, clase I y acídica, clase II clase IV endoquitinasa intracelular clase IV	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Vitis vinifera</i>
nodulación	acídica, clase III	<i>Sesbania rostrata</i>
micorriza	básica, extracelular, clase I	<i>Picea abies</i>
crecimiento	proteína tipo quitinasa (relacionada con la clase II)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
embriogénesis	acídica, extracelular, clase IV extracelular básica, clase IV	<i>Daucus carota</i> <i>Cichorium</i> <i>Picea glauca</i>
resistencia a congelación	extracelular, clase I y clase II intra- y extracelular clase II	<i>Secale cereale</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Cynodon sp.</i>
muerte celular programada	clase IV clase IV	<i>Brassica napus</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
almacenamiento proteico	proteína tipo quitinasa (homóloga a la clase III)	<i>Musa spp.</i>
inhibidor	básica, extracelular endoquitinasa	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Coix lachrymajobi</i>

Tabla II.3. Funciones de las quitinasas vegetales y procesos en los que intervienen (Kasprzewska, 2003)

La expresión de genes de quitinasas en plantas potencia la resistencia frente a patógenos de origen fúngico, especialmente cuando se coexpresan con otros genes relacionados con defensa, como la β -1,3- glucanasa (Bolar *et al.*, 2001; Jach *et al.*, 1995).

2.1.4. Las peroxidasas vegetales

Otra de las proteínas PR son las denominadas peroxidasas (EC 1.11.1.7.), que constituyen una familia de isoenzimas. Son glicoproteínas monoméricas que contienen un grupo hemo y utilizan el H_2O_2 y el O_2 para oxidar una amplia gama de moléculas (donadoras de electrones). Se clasifican normalmente en ácidas, neutras o básicas según su punto isoeléctrico.

La mayoría de las plantas superiores contienen un gran número de peroxidasas, codificadas por familias multigénicas. Se les han atribuido múltiples funciones en las plantas, como la eliminación del H_2O_2 , la oxidación de reductores tóxicos, la biosíntesis y la degradación de la lignina en la pared celular, el catabolismo de la auxina, las respuestas de defensa frente a heridas, ataques por patógenos o insectos, etc. Su regulación atiende a distintos tipos de agentes estresantes, tanto bióticos como abióticos, y a distintos lugares (Yoshida *et al.*, 2003).

Hasta el momento se han descrito numerosas peroxidasas en plantas (Tabla II.4) y se ha estudiado la función de algunas de ellas. Las peroxidasas *tap1* y *tap2*, peroxidasas aniónicas de tomate y patata, respectivamente, se inducen por herida, hongos, elicitores y ABA (Botella *et al.*, 1994a, 1994b; Mohan *et al.*, 1993a). De hecho, se han encontrado en el promotor de algunas de ellas elementos de respuesta al metil jasmonato (Mohan *et al.*, 1993b). Las peroxidasas aniónicas que se hayan asociadas a la pared celular del tabaco, se inducen tras inocular la planta con un patógeno (Mittler *et al.*, 1999a) y usan el H_2O_2 como sustrato para formar los radicales necesarios en la formación de la lignina. Este tipo de peroxidasas, por tanto, contribuyen a engrosar la pared celular, previniendo la entrada y propagación de los patógenos. Como se mencionó en el apartado 1 de esta introducción, el SA, molécula mensajera más característica de la SAR, no inhibe a este tipo de peroxidasa, por lo que no evita que se de un reforzamiento de la pared celular. No obstante al inhibir a otro tipo de enzimas detoxificadoras de formas ROS, como la catalasa y la ascorbato peroxidasa, contribuye al aumento de moléculas mensajeras que inducen una respuesta de defensa en la planta (Bi *et al.*, 1995; Durner & Klessig, 1995; Mittler *et al.*, 1999b; Takahasi *et al.*, 1997).

Las denominadas ascorbato peroxidasas o APX (EC1.11.1.11), constituyen un grupo de isoenzimas cuya síntesis responde a alta intensidad lumínica, sequía, salinidad, y ABA, entre otros agentes (Yoshimura *et al.*, 2000). Reducen el estrés oxidativo al eliminar el H_2O_2 generado en exceso (Mittler *et al.*, 1999). Estas enzimas están distribuidas en distintos compartimentos celulares, como el estroma (sAPX), en la membrana tilacoidal (tAPX) y en el citosol (cAPX). Las APXs protegen cada orgánulo celular y minimizan el daño generado por el estrés oxidativo en el tejido.

Planta	Gen	Análisis funcional y/o de la expresión
<i>Picea abies</i>	<i>SP12</i>	Inducción por patógeno
<i>Gossypium hirsutum</i>	no determinado	Inducción por bacteria
<i>Cucumis sativas</i>	<i>Cuper2</i>	Inducción por etileno
<i>Cucurbita pepo</i>	<i>APRX</i>	Unida a pared celular
<i>Populus</i>	<i>prxA3a, prxA4a</i>	Tallo
	<i>PXP1, PXP11, PXP2, PXP3-4</i>	Xilema y raíz
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>prxCa, prxEa, prxCb</i>	Promotor
	Nueve genes <i>prxr</i>	Todos los órganos
	<i>ATP1a, ATP2a</i>	Todos los órganos
	<i>ATP15a, ATP24a</i>	Inducción por herida (también la <i>ATP2a</i>)
	<i>ATPA2</i>	Promotor
<i>Armoracia rusticana</i>	<i>prxC1</i>	Promotor, análisis transgénico
	<i>prxC2</i>	Inducción por herida, promotor
<i>Glycine max</i>	<i>SPOD4.1, Prx2, Ep</i>	Cubierta de la semilla
<i>Stylosanthes humilis</i>	<i>Sphx6a, Sphx6b</i>	Inducción por patógeno y por jasmónico, promotor
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>prxPNC1, prxPNC2</i>	Inducción por herida
<i>Medicago sativa</i>	<i>Msprx1A, Msprx1b, Msprx1C</i>	Inducción por patógeno
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>tpoxC1</i>	Inducción por TMV
	<i>tpoxN1</i>	Inducción por TMV, herida y etileno
	<i>NtpoxAN</i>	Promotor y análisis transgénico
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>TPX1</i>	Inducción por sal y herida
	<i>TPX2</i>	Análisis transgénico
	<i>TAP1</i>	Promotor (herida), análisis del antisentido
	<i>TAP2</i>	Inducción por herida, análisis del antisentido
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Stprx2</i>	Inducción por herida
<i>Ipomea batatas</i>	<i>Spwa2, Spwa3</i>	Promotor, análisis transgénico
<i>Oryza sativa</i>	<i>POX22.3, POX8.1, POX5.1</i>	Inducción por patógeno
	<i>prxRPA, prxRPN</i>	Inducción por herida
		Promotor (<i>prxRNP</i>)
<i>Triticum aestivum</i>	<i>pox1, pox2, pox3, pox4</i>	Inducción por el hongo del moho (<i>pox2</i>)

Tabla II.4. Genes de las principales peroxidases de plantas (revisado por Yoshida *et al.*, 2003)

2.2. EL ESTRÉS ABIÓTICO

Actualmente, los cambios en el medio ambiente se dan a una velocidad que supera a la de la capacidad de adaptación de muchas especies vegetales. A los cambios climáticos y factores estresantes naturales hay que sumar los cambios provocados por la acción del hombre.

La necesidad de reutilizar para cultivo los suelos desgastados o afectados por la actividad industrial, requiere de la existencia de plantas que toleren estas condiciones. Aunque las plantas cuentan con mecanismos naturales de detoxificación y de respuesta a estrés abiótico, como sequía, salinidad, etc., el acelerado cambio medioambiental precisa de la obtención de especies vegetales que vean incrementada su tolerancia (Apse & Blumwald, 2002; Briat & Lebrun, 1999; Chen & Murata, 2002; Garg *et al.*, 2002). Se han llevado hasta el momento numerosas investigaciones, a este respecto, dentro de los programas de control biológico, de las que hablaremos en el apartado 5 de esta introducción.

2.2.1. Estrés por metales pesados

2.2.1.1. Mecanismo de acción de los metales pesados

Como metal pesado se conoce aquel que posee una $d > 5\text{g/cm}^3$. Algunos pueden tener mayor o menor importancia como metales traza, aunque la mayoría de ellos no poseen función biológica alguna y resultan tóxicos (Weast, 1984).

La adquisición de los metales pesados por las plantas se hace por difusión o con ayuda de microorganismos del suelo, pudiendo acumularse en las paredes celulares (Arduini *et al.*, 1996). Los efectos tóxicos ocurren a nivel intracelular y de membrana plasmática.

La toma de metales puede realizarse de forma pasiva por gradiente de concentración a través de la membrana plasmática, o bien de forma activa (Williams *et al.*, 2000).

La toxicidad que ejercen los metales pesados podría explicarse teniendo en cuenta los mecanismos moleculares en los que incidirían (Schützendübel & Polle, 2002):

a) *Daño oxidativo*

Los metales pesados provocan la aparición de formas ROS por autooxidación o reacciones de tipo Haber-Weiss o Fenton (Briat & Lebrun, 1999). Este daño es típico de metales como el Cu o el Fe. La autooxidación de metales redox activos como el Fe^{2+} o el Cu^{2+} da lugar a la formación de especies reactivas a partir del oxígeno, con el consiguiente daño que generan (apartado 2.1.2.2 de esta introducción). Por otro lado, se ha demostrado que el cobre también induce la síntesis de etileno en tabaco (Avni *et al.*, 1994).

b) *Bloqueo de grupos funcionales esenciales*

Este efecto conduce a la inactivación de las moléculas y es frecuente en metales como el Cd y el Hg, que además generan peroxidación lipídica y acumulación de H_2O_2 , lo que desemboca de nuevo en daño oxidativo.

El Cd interfiere con las cisteínas conservadas de la glutatión reductasa, generando una carencia transitoria de glutatión (GSH), que interviene en la detoxificación de las formas ROS (apartado 2.1.2.2 de esta introducción), provocando por consiguiente un incremento de éstas. Las peroxidasas inespecíficas, como las que oxidan sustratos como el guayacol, también se afectan por el Cd (Schützendübel *et al.*,

2001); desembocando en la lignificación de la raíz como consecuencia del daño oxidativo y perdiendo, por tanto, la capacidad de tomar nutrientes. Cuando la eliminación del metal no es lo suficientemente rápida, se produce una inhibición del crecimiento, una estimulación del metabolismo secundario y una lignificación que conducen a la muerte celular. El Cd, en suma, provoca una pérdida transitoria de la capacidad antioxidativa, acompañada de la producción de peróxidos que pueden actuar como moléculas de señalización en la activación de los mecanismos de defensa, lo que conduce a la muerte de la planta.

Por otra parte, estos metales pesados se unen fuertemente al oxígeno, al nitrógeno y a los átomos de azufre, inactivando numerosas enzimas.

c) *Desplazamiento de iones metálicos esenciales para las biomoléculas*

El desplazamiento de los metales de los grupos funcionales conduce a la inactivación de las moléculas y es típico de metales como el Cd y el Zn. El ión Cd^{2+} desplaza al Ca^{2+} en la calmodulina, bloqueando la señalización celular dependiente de ésta (Rivetta *et al.*, 1999). El Zn^{2+} desplaza al Mg^{2+} , inactivando la enzima ribulosa-1,5-bifosfato-carboxilasa/oxigenasa (van Assche & Clijsters, 1986).

2.2.1.2. Mecanismos naturales de detoxificación

El daño que los metales pesados generan sobre los organismos vivos implica mecanismos oxidativos y genotóxicos. La protección de la planta frente a esta toxicidad se consigue controlando la entrada de metales por la raíz y su distribución en la planta (Briat & Lebrun, 1999).

Los metales pasan de la raíz al apoplasto, el cual juega un papel importante en cuanto al transporte y la distribución de iones entre los tejidos y las células, así como en la respuesta al estrés. La acumulación de metales, como el Cu o el Zn, en el apoplasto lo convierte en un almacén transitorio de éstos. En la mayoría de las plantas las vacuolas, que suponen el 80-90% del volumen total de la célula, comprenden el principal lugar de almacenamiento de metales (Wink, 1993).

Dentro de la célula existen proteínas encargadas de secuestrar determinados metales contribuyendo así a la detoxificación. Las **ferritinas** son proteínas capaces de quelar miles de átomos de Fe (Harrison *et al.*, 1996). Las **metalotioneinas** son proteínas pequeñas, en torno a 6-7 kDa, que quelan excesos de Zn, Cu, Cd al interaccionar estos metales con las cisteínas, dispuestas en la proteína como repeticiones CysXCys o CysXXCys (Robinson *et al.*, 1993). Las **fitoquelatinas**, también llamadas metalotioneinas de clase III, son péptidos que derivan del glutatión y que quelan Cd, Cu y Zn, entre otros metales (Rausser, 1995).

La célula también cuenta con **compuestos de bajo peso molecular** como ácidos orgánicos, aminoácidos y derivados de éstos, que resultan fundamentales para la homeostasis del metal en la planta (Briat & Lebrun, 1999). Entre los ácidos orgánicos, que son los principales quelantes en el xilema, hallamos el citrato, el malato y el oxaloacetato (Cataldo *et al.*, 1988). Por otro lado, existen aminoácidos con especial afinidad por los metales pesados, como la histidina libre, o el derivado de la metionina nicotianamina (NA), que quela fundamentalmente Fe, Cu y Zn (Stephan *et al.*, 1996). El fitato, que deriva del mioinositol, es otro compuesto de bajo peso molecular que almacena en las semillas fundamentalmente Zn, Fe, Mn, Na, Ca y Mg, entre otros metales (Van Steveninck *et al.*, 1993).

Otro de los mecanismos naturales con que cuenta la planta para eliminar el exceso de metal pesado es el **flujo activo**. En *Arabidopsis* se ha hallado un transportador de metales pesados dependiente de ATP (Tabata *et al.*, 1997).

La detoxificación se puede llevar a cabo, por tanto, mediante la unión de los metales a la pared celular, la compartimentalización, la quelación y la eliminación por flujo de estos.

En la naturaleza se hallan plantas hiperacumulativas, como la mayoría de las pertenecientes a la familia *Brassicaceae*, que son capaces de acumular cantidades elevadas de Pb, Cd, Ni, Zn, Cr y Cu; por lo que son utilizadas en muchos procesos de fitoextracción de metales del suelo (Salt *et al.*, 1995).

2.2.2. Estrés salino y osmótico

2.2.2.1. El daño generado por el estrés salino y osmótico

La sequía, las bajas temperaturas y la salinidad son factores medioambientales a los que los cultivos están expuestos con frecuencia y provocan un déficit de agua que afecta al crecimiento, al desarrollo y a la expresión génica. Aunque estos factores estresantes presentan distinta naturaleza y pueden elicitar respuestas específicas en la planta, también activan reacciones comunes en ésta (Figura II.4). El cierre de estomas, la pérdida de la turgencia y el cambio en la composición de la pared celular o las membranas, son algunos de los cambios que ocurren y que pueden actuar como señal de activación de los mecanismos de adaptación en la planta (Kizis *et al.*, 2001).

La alta salinidad genera tanto estrés iónico como osmótico (Zhu, 2002). El estrés salino disrumpe la homeostasis iónica en la planta, resultando en un exceso de iones Na^+ en el citoplasma y en una deficiencia de iones esenciales como el K^+ (Serrano & Rodríguez Navarro, 2001; Zhu, 2001a, 2001b). La toxicidad del Na^+ también se manifiesta en la inhibición que genera sobre numerosos procesos bioquímicos claves para la célula, al competir por sitios de unión de otros iones como el K^+ (Apse & Bumwald, 2002).

La ruta de respuesta al estrés salino está siendo ampliamente estudiada en *Arabidopsis*, donde se han caracterizado los mutantes *sos1*, *sos2* y *sos3*, que presentan hipersensibilidad ante iones Na^+ y Li^+ (Zhu, 2001a). Estos fenotipos condujeron a la identificación de los genes *SOS* y al estudio de la función que ejercían en este tipo de estrés. *SOS1* codifica un antiportador Na^+/H^+ localizado en la membrana plasmática (Shi *et al.*, 2000). *SOS2* codifica una proteína quinasa de serina/treonina, cuyo dominio catalítico se halla en el extremo amino terminal, que interacciona intramolecularmente con la zona reguladora de la proteína, situada en el extremo carboxilo terminal (Guo *et al.*, 2001). *SOS3* codifica una proteína de unión a calcio, que probablemente sensa los cambios en la concentración intracelular de este ion, inducido por el estrés salino (Ishitani *et al.*, 2000). *SOS3* interacciona con *SOS2* e intervienen en la activación del antiportador codificado por *SOS1*, que expulsa el exceso intracelular de iones sodio (Halfter *et al.*, 2000).

La tolerancia y la respuesta al estrés iónico conllevan la activación de una ruta dependiente de *SOS*, mientras que, el estrés osmótico dispara una ruta independiente de estos genes, que activa a una serie de proteínas kinasas, como la SIMK (salt-stress inducible protein kinase) o la SIPK (Zhu, 2001a). En la Figura II.5 se representa un esquema de los mecanismos de respuesta a estrés salino y osmótico.

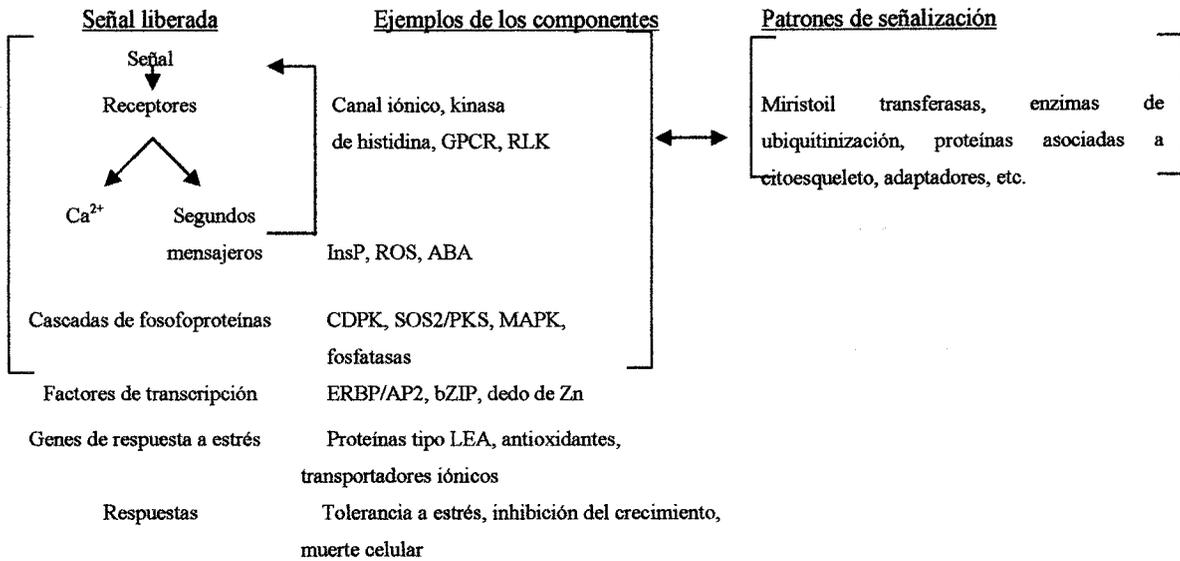


Figura II.4 Ruta de transducción general frente a condiciones de frío, sequía y estrés salino en plantas (Xiong *et al.*, 2002). En cada paso se proponen ejemplos de los componentes de la ruta de transducción de señales. La reamplificación de la señal se esquematiza con una flecha de retroceso. Los patrones de señalización propuestos en el esquema pueden estar regulados por la ruta general previamente a la específica. GPCR, receptor acoplado a proteína-G; RLK, receptor de tipo kinasa; InsP, inositol polifosfatos; CDPK, proteína kinasa dependiente de Ca²⁺; SOS2/PKS, proteína kinasa de serina/treonina; ROS, formas activas de oxígeno; ABA, ácido abscísico; ERBP/AP2, factor de transcripción de respuesta a etileno.

2.2.2.2. Mecanismos naturales de protección

Hasta el momento, en la planta se conocen numerosos transportadores iónicos que se encuentran activos durante el estrés salino en la membrana plasmática y en el tonoplasto (Serrano & Rodríguez-Navarro, 2001). Las respuestas activas frente al estrés salino pueden ser dependientes de la hormona ABA o independientes de ésta (Kizis *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2002; Zhu, 2002).

La tolerancia al estrés salino en las plantas se da de forma natural por la acumulación de los denominados **solutos compatibles** u **osmoprotectantes**, que son compuestos de bajo peso molecular, muy solubles y que carecen de toxicidad alguna incluso a altas concentraciones. Estos solutos se acumulan en distintas especies vegetales y pueden ser betainas y compuestos relacionados; azúcares y polialcoholes, como el manitol, el sorbitol y la trealosa; y aminoácidos como la prolina (Chen & Murata, 2002). Estos compuestos contribuyen a la eliminación del estrés oxidativo, de la peroxidación lipídica y a la estabilización de los complejos proteicos de las membranas (Apse & Blumwald, 2002).

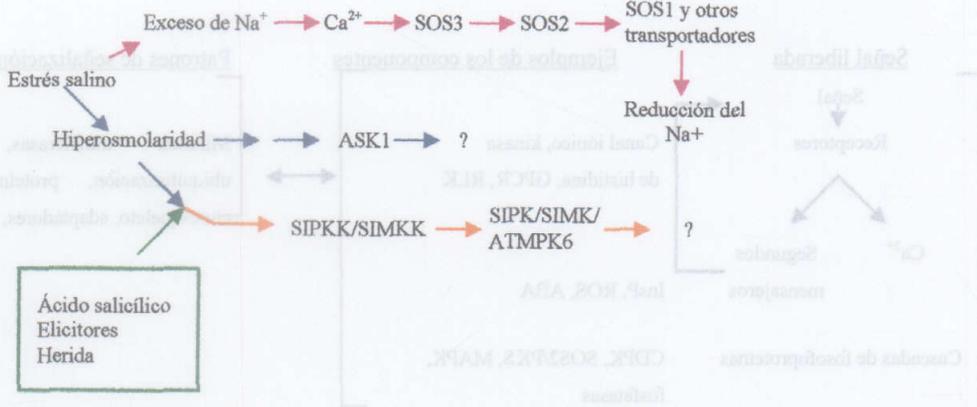


Figura II.5. Ruta de transducción de señales del estrés salino (Zhu, 2001a). Un exceso de sodio en el medio de cultivo activa una señal de calcio en el citoplasma que es supuestamente detectada por la proteína SOS3, la cual interacciona con la proteína quinasa SOS2. Esta interacción parece regular la transcripción y la actividad del transportador iónico SOS1, que contribuye a reducir la concentración tóxica de iones Na^+ en el citoplasma hasta niveles normales. Por otro lado, el estrés salino genera hiperosmolaridad, la cual activa a la proteína quinasa ASK1 y a rutas dependientes de MAP kinasas. Esta ruta también es activada por otras señales, como salicílico, elicitores y también por herida. Las kinasas SIPK, SIMK y la ATMPK6 son MAP kinasas homólogas de tabaco, alfalfa y *Arabidopsis*, respectivamente. La SIPK y la SIMK son MAP kinasas que interaccionan con la SIPK y la SIMK respectivamente. Las interrogaciones indican que las dianas de las rutas de las kinasas se desconocen por el momento.

2.3. INTERCONEXIÓN ENTRE LAS RUTAS DE RESPUESTA AL ESTRÉS ABIÓTICO Y BIÓTICO

Como se mencionó en el apartado 1 de esta introducción, la respuesta a condiciones de estrés conlleva una ruta de transducción de señales, que culmina en una reamplificación de la señal mediante una segunda ronda de señalización en la intervienen, entre otras moléculas, el ácido abscísico (ABA), el etileno y el ácido salicílico (SA) [Xiong *et al.*, 2002].

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la interconexión que existe entre las rutas de respuesta a los distintos tipos de estrés que afectan a la planta, muchas de las cuales se habían considerado independientes e incluso antagónicas (Ellis & Turner, 2001; Maleck & Dietrich, 1999; Schenk *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002). El estudio sobre la conexión entre la transducción de señales generada por las formas ROS y el estrés osmótico está comenzando a emerger (Xiong & Zhu, 2002). No obstante, la implicación de las ROS durante la patogénesis sí está bien documentada (Lamb & Dixon, 1997).

Las proteínas MAP kinasas son un claro ejemplo de moléculas que participan en diferentes rutas de transducción de señales originadas por estímulos de distinta naturaleza: infección por patógeno, herida, temperatura, sequía, salinidad, presión osmótica, radiación ultravioleta y formas activas de oxígeno. El estrés abiótico y biótico activan kinasas consideradas inicialmente específicas de un determinado tipo de estrés, como la SIPK o la SIMK y la WIPK, inducidas por salicílico, sal y herida, respectivamente (Droillard *et al.*, 2000; Hoyos & Zhang, 2000; Kizis *et al.* 2001;

Mikolajczyk *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2000; Zhang & Klessig, 2001; Zhang & Liu, 2001; Zhu, 2001a).

Se han realizado estudios que demuestran la activación, mediante los mismos factores de transcripción, de genes que se expresan bajo distintos tipos de estreses. Así, por ejemplo, el factor ERF (ethilene response factor) inducido por etileno, activa genes que se expresan por frío, sequía, infección por patógeno y herida; el factor bZIP, que se une a la región reguladora de determinados genes de PRs, responde a sal, sequía y luz ultravioleta; el factor WRKY, que se expresa tras la infección de diferentes patógenos y por herida (Ellis *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002); y el gen *Tsi* de tabaco, que codifica un factor de transcripción (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995), el cual se induce por estrés salino, herida, ácido salicílico y ácido jasmónico (Park *et al.*, 2001). Estos ejemplos ponen de manifiesto el cruce de las rutas de transducción de señales del estrés biótico y abiótico.

Asimismo, el análisis de los patrones de expresión de genes marcadores de la senescencia y de la muerte celular programada en la planta, confirma el cruce de las distintas rutas de transducción de señales. Los genes *HSR203J* y el *HIN1*, marcadores de la respuesta hipersensible en tabaco, también se inducen en presencia de metales pesados como el cobre (Pontier *et al.*, 1999).

Por tanto, los mecanismos de respuesta de las plantas frente a un tipo de estrés, pueden conducir en última instancia a la activación de otros mecanismos que protegen frente a otros estreses diferentes, manteniendo así a la planta en un estado de alerta generalizado. Un esquema de lo mencionado anteriormente se detalla en la Figura II.6.

3. LOS ELICITORES EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA

Como elicitores se definen aquellos productos procedentes de los genes de avirulencia de los patógenos, de la pared celular del patógeno o de la de la propia planta, que activan las respuestas de defensa de ésta (Ebel, 1988). Pueden tener distinta naturaleza, pueden ser glicopéptidos, péptidos, proteínas o carbohidratos. Entre los mejor caracterizados están las elicinas, que son elicitores proteínicos que derivan de la pared celular del hongo *Phytophthora* (Ito *et al.*, 1997); y las denominadas oligosacarinas (OGAs), que son carbohidratos con actividad biológica, pues actúan como moléculas señal (Fry *et al.*, 1993; Monhen & Hahn, 1993). En las células de tabaco se ha propuesto un modelo de actuación de las OGAs, en el que tras un flujo de iones K^+ y Cl^- , una bajada del pH citosólico y una movilización de iones Ca^{2+} , la membrana se despolariza y se activan una serie de genes, entre ellos el que codifica la fenil amonio liasa (Ridley *et al.*, 2001).

Los OGAs se pueden unir a la pared celular mediante interacciones iónicas. La pared celular actuaría como “receptor” y la interacción generaría cambios en la tensión de ésta, que transmitidos al citoesqueleto originaría una cascada de señalización (Faik *et al.*, 1998). La existencia de un receptor específico en la pared celular es otra de las hipótesis barajada, de hecho, se ha descrito una proteína de patata denominada remorina, que interacciona con los OGAs, que es fosforilada *in vitro* y que podría actuar como receptor (Reymond *et al.*, 1996).

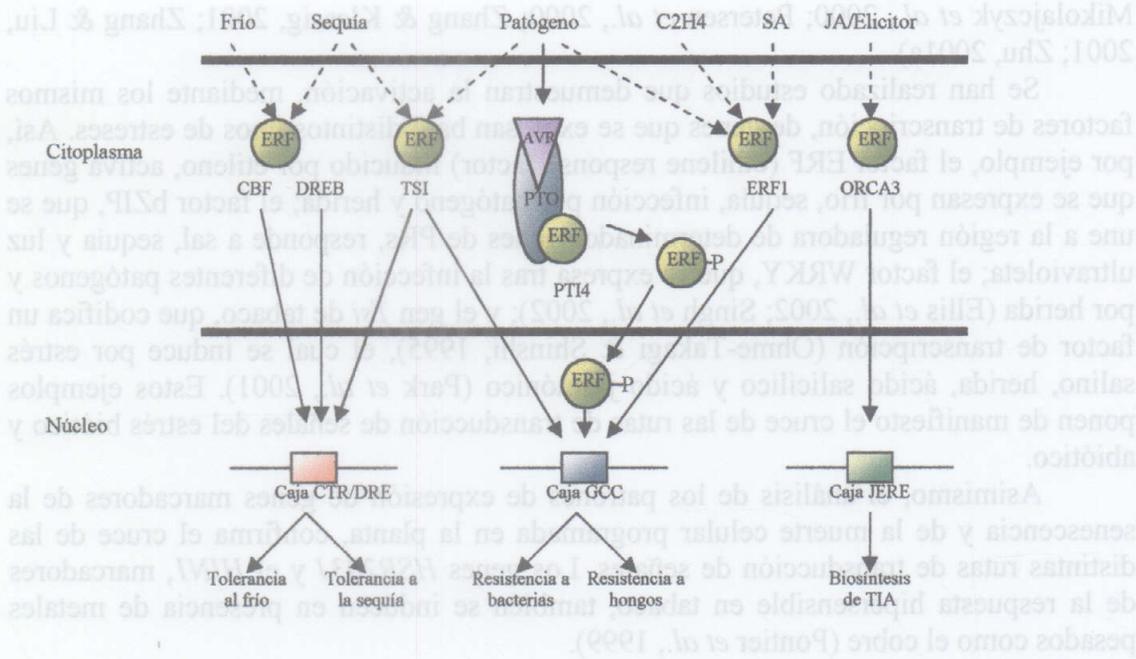


Figura II.6 Representación esquemática de algunas rutas de respuesta a estrés y defensa en las que intervienen los factores de transcripción ERF (Singh *et al.*, 2002). Los elementos que participan en el proceso de reconocimiento se desconocen hasta el momento, y se indican mediante flechas discontinuas. La flecha continua designa la interacción del producto del gen *Avr* con el de resistencia PTO de tomate a *Pseudomonas syringae*. La interacción de la proteína PTI4 con la PTO desencadena la fosforilación del factor ERF (de respuesta a etileno). La proteína ORCA3, de respuesta a *Catharanthus*, es fosforilada antes de interaccionar con el elemento JERE, presente en la región reguladora de los genes de respuesta a jasmónico y a elicitors, implicados en la síntesis de alcaloides y terpenoides (TIA). Los elementos ERF interaccionan también con los de respuesta a sequía e infección por patógeno (TSI), con los elementos de unión a las cajas CRT (CBF) y con elementos de respuesta a desecación o DRE (DREB).

4. MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS FRENTE A ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR ESTRÉS

Numerosos trabajos describen la obtención de plantas más tolerantes al estrés salino y a la sequía, mediante la expresión de genes que intervienen en el flujo activo de los iones, como el antiportador Na^+/H^+ codificado por el gen *SOS1* de *Arabidopsis thaliana* (Shi *et al.*, 2003). Un efecto similar frente al estrés salino y térmico, entre otros, se ha obtenido al expresar en tabaco la enzima glutatión S-transferasa, que reduce el daño oxidativo (Roxas *et al.*, 2000). Otra de las proteínas que constituye un potente regulador de la homeostasis iónica está codificada por el gen *HAL1* de *S. cerevisiae*; su expresión en melón mejora la tolerancia de éste al estrés salino, aunque afecta su crecimiento vegetativo (Bordas *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1999). Un efecto similar sobre tolerancia a salinidad y crecimiento vegetativo se observa en tomates transgénicos para este gen (Gisbert *et al.*, 2001; Rus *et al.*, 2001).

Otra de las estrategias de los programas de biocontrol, ha consistido en la expresión de genes que codifican osmoprotectantes (apartado 2.2.2.2 de esta introducción). Los genes bacterianos *otsA* y *otsB*, necesarios para la síntesis de trealosa, se han expresado en arroz obteniéndose líneas transgénicas con mejor crecimiento y

mejor balance mineral bajo condiciones de sal, sequía y bajas temperaturas (Garg *et al.*, 2002). La expresión del gen de levadura *TPS1*, en plantas de tabaco, permite la síntesis de trealosa originando plantas más tolerantes a la salinidad y a la sequía (Serrano *et al.*, 1999). Plantas de tabaco con mayor resistencia al estrés osmótico y a bajas temperaturas se han obtenido mediante la expresión en tabaco de un soluto compatible como es la glicina betaína (Apse & Blumwald, 2002; Chen & Murata, 2002; Holmström *et al.*, 2000).

La manipulación de los niveles de formas ROS, ha sido otra de las estrategias para la obtención de plantas más tolerantes a condiciones ambientales adversas (Roxas *et al.*, 2000; Veena *et al.*, 1999). La expresión de la peroxidasa *TPX2* de tomate aumenta la tasa de germinación de las semillas de tabaco que portan este gen, debido a una mayor retención de agua en sus paredes (Amaya *et al.*, 1999). Las peroxidasas *swpal* y *swpn1* de batata expresadas en tabaco palián notablemente el daño ocasionado por agentes químicos (Yun *et al.*, 2000). Asimismo, plantas de tabaco deficientes en la catalasa *Cat1AS*, presentan niveles subletales de formas ROS, que mantienen activos los sistemas de defensa e incrementan de este modo su tolerancia frente a patógenos (Chamnonpol *et al.*, 1998).

El estrés producido por los metales pesados, se ha combatido principalmente mediante la expresión de quelantes o de enzimas detoxificadoras de las formas ROS (Briat & Lebrun, 1999; Deák *et al.*, 1999; Schützendübel & Polle, 2002).

La lucha contra el estrés biótico se ha abordado introduciendo en las plantas genes que codifican proteínas PR, como quitinasas y glucanasas (Alexander *et al.*, 1993; Bolari *et al.*, 2001; Jach *et al.*, 1995; Lorito *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1994); y combinaciones de genes *Avr* y *R* que generan interacciones incompatibles, para mantener así activados los mecanismos de defensa (Laugé & De Wit, 1998).

Un hecho importante ha sido la constatación de la convergencia entre las rutas de respuesta al estrés biótico y abiótico. De hecho, la sobreexpresión del factor de transcripción *Tsi* en tabaco, no sólo mejora la tolerancia frente al estrés producido por patógenos, sino que también lo hace frente al estrés osmótico (Park *et al.*, 2001). De igual forma, se obtiene una mejora frente al daño por metales pesados y por patógenos al expresar en tabaco una ferritina de alfalfa (Deák *et al.*, 1999).

4.1. PLANTAS DE TABACO PORTADORAS DE LAS QUITINASAS CHIT33 y CHIT42 DE *T. harzianum*

Uno de los objetivos principales de nuestro grupo de investigación, ha sido la obtención de plantas transgénicas de tabaco más resistentes a fitopatógenos fúngicos, mediante la expresión de genes de *Trichoderma harzianum* que codifican enzimas hidrolíticas. Mediante trabajos previos, se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco portadoras de los genes que codifican las quitinasas CHIT42 y CHIT33 de *T. harzianum* CECT 2413 (García, 1997, Tesis Doctoral; Cubero, 1997, datos no publicados). En el presente trabajo se ha llevado a cabo la obtención de plantas portadoras de ambas quitinasas, y el análisis funcional de las diferentes líneas transgénicas obtenidas (desarrollado en *ResultadosII*).

Estas quitinasas juegan un importante papel en el proceso de micoparasitismo de *Trichoderma* (Dana *et al.*, 2001, García *et al.*, 1994; Limón *et al.*, 1999), por lo que su expresión en plantas podría aumentar la resistencia de éstas frente a patógenos de origen fúngico; como ya se había observado al expresar, entre otros, el gen *chit42* de *T.*

harzianum en sistemas tanto homólogos como heterólogos (Bolar *et al.*, 2001; Lorito *et al.*, 1998; Jach *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1994).

Las quitinasas CHIT33 y CHIT42 no presentan una homología importante entre ellas, ambas carecen de dominio de unión a quitina y presentan actividad endoquitinasa y presentan sinergismo, *in vitro*, cuando se incuban frente a una suspensión de paredes celulares purificadas de *B. cinerea* (de la Cruz *et al.*, 1992; de la Cruz *et al.*, 1993). La homología de estas enzimas con la de otros organismos se esquematiza en la Tabla II.5.

Organismo	Proteína	% Identidad	Tamaño del alineamiento (aa)		
CHIT42	<i>Trichoderma hamatum</i>	Endoquitinasa	86	428	
	<i>A. album</i>	Chi1	75	423	
	<i>Bacillus circulans</i>	Chi1	32.8	290	
	<i>Serratia marcescens</i>	ChiA	31.1	341	
	<i>Alteromonas sp.</i>	Precursor de la quitinasa ChiA	32.9	161	
	<i>Streptomyces lividans</i>	Precursor de la quitinasa C	34.7	366	
	<i>Streptomyces plicatus</i>	Precursor de la quitinasa 63	33	376	
	<i>Serratia marcescens</i>	Precursor de la quitinasa ChiB	36.5	178	
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Precursor de las subunidades α y β de la toxina killer	23.2	328	
	CHIT33	<i>Candida albicans</i>	Chi2	41	297
		<i>C. albicans</i>	Chi3	41	300
		<i>S. cerevisiae</i>	Cts1	45	286
		<i>C. albicans</i>	Chi1	40	289
<i>Rhizopus niveus</i>		Chi1	40	289	
<i>Rhizopus oligosporus</i>		Chi1	39	296	
<i>R. oligosporus</i>		Chi2	38	289	
<i>Emericella nidulans</i>		Chi	38	289	
<i>Coccidioides immitis</i>		Chi2	36	288	
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>		Chi	35	300	
<i>Fragaria ananasa</i>		Chi	33	290	
<i>Oryza sativa</i>		Chi clase III	36	293	
<i>Vitis vinifera</i>		ChiA	33	292	
<i>Nicotiana tabacum</i>		Chi básica	34	275	
<i>Zea mays</i>		Chi PRm	35	292	
<i>Hevea brasiliensis</i>		Chi	34	292	
<i>H. brasiliensis</i>		Hevamina	34	292	
<i>Arabis glabra</i>		Chi ácida	35	277	
<i>Phytolacca americana</i>		ChiB	45	288	
<i>Beta vulgaris</i>		ChiE	34	292	
<i>Arabidopsis thaliana</i>		Chi ácida	35	277	
<i>Glicine max</i>	Chi clase III	32	292		
<i>Sphenostylis stenocarpa</i>	Chi clase III	32	282		
<i>Vigna unguiculata</i>	Chi clase III	33	292		
<i>Arabis gemmifera</i>	Chi ácida	35	277		
<i>Oryza sativa</i>	OsChib3b	33	293		

Tabla II.5. Porcentaje de identidad de CHIT42 y CHIT33 con otras proteínas

La quitinasa CHIT42 presenta una homología significativa con otras quitinasas, en particular con la quitinasa Chi1 del hongo fitopatógeno *A. album*, siendo menor con otras de origen fúngico y bacteriano. La zona más conservada, presente en todas ellas, corresponde al dominio catalítico de la enzima. La secuencia de CHIT42 revela la existencia de un péptido señal, implicado en la exportación de la enzima y de un péptido de activación, cuya proteólisis es necesaria para su correcto funcionamiento (García *et al.*, 1994). Su inducción en *T. harzianum* responde a la presencia de quitina y de paredes de hongos, así como a la carencia de fuente de carbono; en el caso de la enzima CHIT33, su expresión es máxima en ausencia de fuente de carbono (Dana *et al.*, 2001; García *et al.* 1994; Limón *et al.*, 1995). Además de intervenir en los procesos de antagonismo, también participa en procesos de morfogénesis y diferenciación (Carsolio *et al.*, 1994).

CHIT33 presenta una homología elevada con quitinasas de hongos y de plantas, no encontrándose una homología significativa con las quitinasas de bacterias (Tabla II.4; Limón *et al.*, 1995). La homología se halla fundamentalmente en el sitio activo de las enzimas, donde también la comparte con la CHIT42. Su secuencia contiene una región correspondiente a un péptido señal, su pI teórico es ácido (Limón, Tesis Doctoral, 1999). La ausencia de los tres dominios característicos de las quitinasas fúngicas, entre el que se encuentra el dominio de unión a quitina, sugiere que esta enzima probablemente esté más implicada en el saprofitismo y el antagonismo, que en procesos morfogenéticos (Limón *et al.*, 1995). La homología que presenta con las quitinasas vegetales sugiere una función similar a la de estas proteínas PR. Además constituye una molécula de origen fúngico, lo que puede elicitar los mecanismos de defensa; como ocurre en el caso de la xilanasas de *T. viride* en tabaco. Este último hecho podría ocurrir, del mismo modo, con la quitinasa CHIT42 (Yamamoto *et al.*, 1999).

Numerosos trabajos han descrito la presencia de quitinasas en plantas y su inducción frente a patógenos (Busam *et al.*, 1997; Esaka & Teramoto, 1998; Maleck & Dietrich, 1999; Montesinos *et al.*, 2002; Zhao & Chye, 1999). Además de la función defensiva que pueden realizar, las quitinasas vegetales también participan en procesos de morfogénesis (Büchter *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1994; Harikrishna *et al.*, 1996; Neale *et al.*, 1990). Las quitinasas se localizan bien en el apoplasto o en las vacuolas. Las localizadas en el apoplasto constituirían el primer frente o barrera contra los fitopatógenos; por un lado impedirían la propagación del hongo y, por otro, liberarían elicitores que activarían los mecanismos de defensa: Las quitinasas vacuolares, en cambio, actuarían en una etapa más tardía de la infección, en la que se liberan diferentes enzimas hidrolíticas para degradar el fitopatógeno (Collinge *et al.*, 1993).

La expresión de la CHIT42 de *T. harzianum* en plantas de tabaco no ha producido alteraciones en la morfología de las estructuras vegetativas de la planta ni la de sus órganos reproductores (García, 1997, Tesis Doctoral; Lorito *et al.*, 1998). Sin embargo, aumenta significativamente la resistencia de las germinulas y de las plantas adultas a la infección por *R. solani* (Lorito *et al.*, 1998) y *Alternaria alternata* (García, 1997, Tesis Doctoral). La localización apoplástica de CHIT42, planteó la hipótesis de que pudiera actuar de forma sinérgica con las quitinasas vegetales, potenciando la batería de enzimas hidrolíticas, contribuyendo a la liberación de elicitores a partir de las paredes celulares del patógeno en las etapas tempranas de la infección. La expresión de CHIT33 en tabaco, de igual modo, no produce alteraciones de ningún tipo en la planta (Cubero, 1997, datos no publicados).

En el presente trabajo se lleva a cabo el análisis funcional de las plantas portadoras del gen *chit42* (plantas psCHIT42), del gen *chit33* (plantas psCHIT33) y de ambos genes (plantas psCHIT33x42).

Resultados II

1. EXPRESIÓN DE LA QUITINASA CHIT33 EN PLANTAS DE TABACO

1.1. OBTENCIÓN DE LAS PLANTAS psCHIT33

En una etapa anterior a la realización de este trabajo, en nuestro laboratorio, se generaron plantas transgénicas de tabaco portadoras del gen *chit42*, que codifica la quitinasa CHIT42 de *T. harzianum* CECT 2413 (Figura II.7A); con el propósito conseguir líneas más resistentes a infecciones producidas por fitopatógenos de origen fúngico (García, 1997, Tesis Doctoral; Lorito *et al.*, 1998). El análisis funcional de estas plantas transgénicas mostró que poseían, tanto a nivel de germinulas como de plantas adultas, mayor resistencia frente al hongo *R. solani* (Lorito *et al.*, 1998). Estos resultados condujeron a la obtención de nuevas plantas, que portaran en este caso el gen *chit33* de *T. harzianum* CECT 2413, que codifica la quitinasa CHIT33, cuya participación en el antagonismo frente a hongos fitopatógenos había sido demostrada previamente (Dana *et al.*, 2001; Limón *et al.*, 1999).

En las plantas portadoras del gen *chit42* (psCHIT42), la zona codificante de la quitinasa se fusionó a la de un péptido señal procedente del gen *PI-p14* de tomate, que codifica una proteína PR (Figura II.7A). Esta fusión se llevó a cabo para evitar posibles problemas en el reconocimiento de un péptido señal heterólogo de origen fúngico y para facilitar su exportación al apoplasto, donde podría actuar conjuntamente con las quitinasas vegetales en los procesos de defensa.

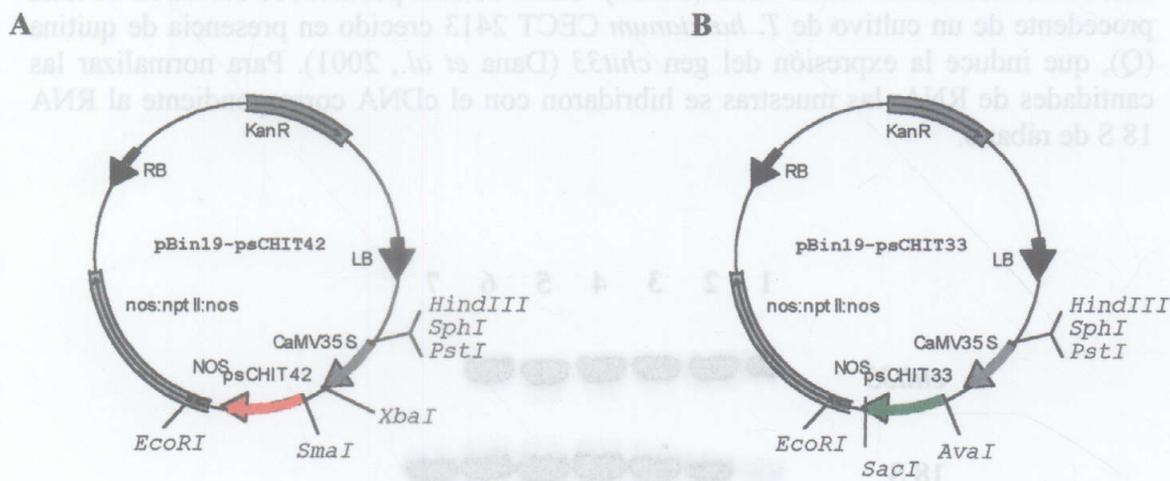


Figura II.7. Construcciones realizadas para la obtención de las plantas transgénicas portadoras de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413. A, construcción de las plantas psCHIT42; B, construcción correspondiente a las plantas psCHIT33.

Las construcciones con las distintas quitinasas se realizaron en el vector pBI221, que contiene un sitio de clonación múltiple entre el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) y el terminador NOS del gen de la nopalina sintetasa. Como marcador de selección se utilizó la resistencia a kanamicina, proporcionada por el plásmido binario pBin19 (García, 1997, Tesis Doctoral).

La proteína CHIT42 se exportaba correctamente al espacio apoplástico, como se comprobó por inmunolocalización. Las plantas transgénicas presentaban fenotipos y tasas de crecimiento similares a las plantas control (García, 1997, Tesis Doctoral).

La obtención de plantas portadoras del gen *chit33* (psCHIT33) se llevó a cabo del mismo modo que la de plantas psCHIT42. Se incluyó en la construcción el péptido señal de la proteína PR de tomate y el terminador NOS (Figura II.7B), para dirigir la proteína sintetizada al apoplasto y evitar la posible inestabilidad del mRNA conferida por la zona 3' no codificante heteróloga, respectivamente.

A partir de la construcción psCHIT33 se aislaron cinco líneas transgénicas independientes, cuyo análisis preliminar se realizó con anterioridad a la realización de este trabajo (Cubero y Dana, datos no publicados).

1.2. ANÁLISIS NORTHERN DE LAS PLANTAS psCHIT33

La expresión en las plantas transgénicas de tabaco del gen quimérico *ps::chit33::nos* se determinó mediante análisis northern (apartado 10 de *Materiales y Métodos*). Para ello se aisló RNA total a partir de hojas de plantas adultas de tabaco de las diferentes líneas transgénicas y se hibridó con un fragmento de DNA que contenía la secuencia del gen *chit33* de *T. harzianum* CECT 2413 (Figura II.8), aislado a partir del plásmido pSK-CHIT33 (apartado 3.1.2 de *Materiales y Métodos*). Como control negativo se utilizó RNA total procedente de una línea transgénica obtenida a partir de la transformación con el vector vacío (Bin19). Como control positivo, se utilizó RNA total procedente de un cultivo de *T. harzianum* CECT 2413 crecido en presencia de quitina (Q), que induce la expresión del gen *chit33* (Dana *et al.*, 2001). Para normalizar las cantidades de RNA, las muestras se hibridaron con el cDNA correspondiente al RNA 18 S de rábano.

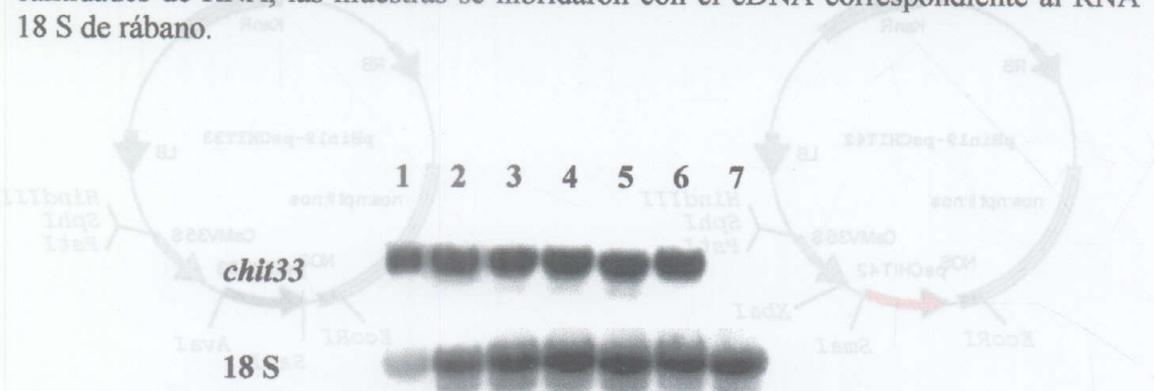


Figura II.8 Análisis northern de las plantas psCHIT33. 1, RNA de *T. harzianum* crecido en presencia de quitina durante 8 h; 2, psCHIT33.10; 3, psCHIT33.9; 4, psCHIT33.6; 5, psCHIT33.5; 6, psCHIT33.4 y 7, línea transgénica Bin19.

Como se observa en la Figura II.8, el nivel de expresión de RNA *chit33* es muy parecido en las diferentes líneas transgénicas. La inexistencia de señal en las plantas transgénicas Bin19, confirma la ausencia de expresión de genes de tabaco con homología a *chit33*.

1.3. ANÁLISIS WESTERN DE LAS PLANTAS psCHIT33

Para determinar que la proteína CHIT33 se sintetizaba y se procesaba correctamente en las plantas transgénicas, se analizaron extractos proteicos de hojas de planta adulta, de cada una de las líneas transgénicas originadas de forma independiente. Las proteínas se resolvieron en un gel de acrilamida, se transfirieron a un filtro y se incubaron frente a un anticuerpo policlonal específico contra la proteína de fusión GST-CHIT33. La cantidad de proteína de cada una de las muestras resueltas en el gel se determinó mediante tinción con azul de Coomassie (Figura II.9A, apartado 13.4 de *Materiales y Métodos*).

Tras el procesamiento del filtro incubado con el anticuerpo se observó en cada una de las muestras, correspondientes a las plantas psCHIT33, una banda que migraba a la misma altura que la proteína CHIT33 de *T. harzianum*, utilizada como control positivo (Figura II.9B). Este resultado sugería que la proteína se sintetizaba correctamente y que el péptido señal de la proteína PR de tomate se procesaba también correctamente.

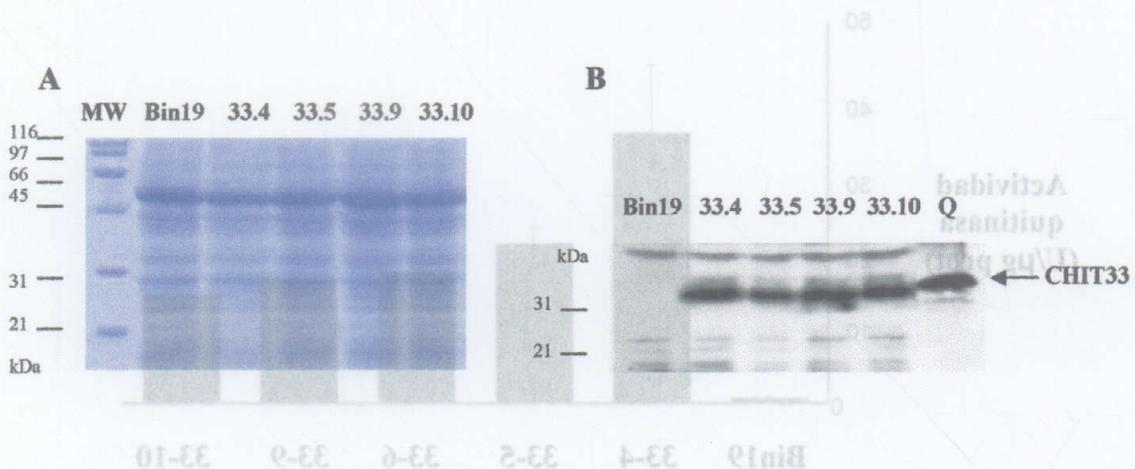


Figura II.9. Detección de la proteína CHIT33 en extractos proteicos totales de las plantas psCHIT33. A, tinción del gel con azul de Coomassie. MW, marcador de peso molecular de proteínas (kDa); Bin19, muestra control. B, inmunodetección de la proteína CHIT33 en los extractos totales. Se analizaron las líneas que iban a ser utilizadas posteriormente en el análisis funcional. Como control positivo se utiliza sobrenadante de un cultivo de *T. harzianum* CECT 2413 crecido en presencia de quitina durante 12 h (Q). Como control negativo se utiliza una línea de tabaco transformada con el vector vacío (Bin19). En cada carril se cargaron 10 μ g de proteína. La dilución de anticuerpo usada fue de 1:12000.

La expresión de la quitinasa en las plantas psCHIT33 no produce ninguna alteración ni en las estructuras vegetativas de la planta ni en los órganos reproductores, lo cual coincide con lo observado en las plantas psCHIT42 (García, 1997, Tesis Doctoral; Lorito *et al.*, 1998).

1.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINASA DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS psCHIT33

Para determinar si la quitinasa que expresaban las plantas psCHIT33 era funcional, se realizaron medidas de actividad quitinasa de extractos proteicos de hojas de plantas que habían crecido en condiciones control, es decir, no sometidas a ningún tipo de estrés.

Un método de medida de la actividad quitinasa muy sensible es el basado en la utilización del sustrato fluorescente 4- β -metilumbeliferil-N, N', N'', N'''-tetraacetilquitotetraosa (apartado 17.3 de *Materiales y Métodos*). Los resultados obtenidos indican una mayor actividad quitinasa en los extractos de las plantas transgénicas con respecto a los de las plantas control (Figura II.10).

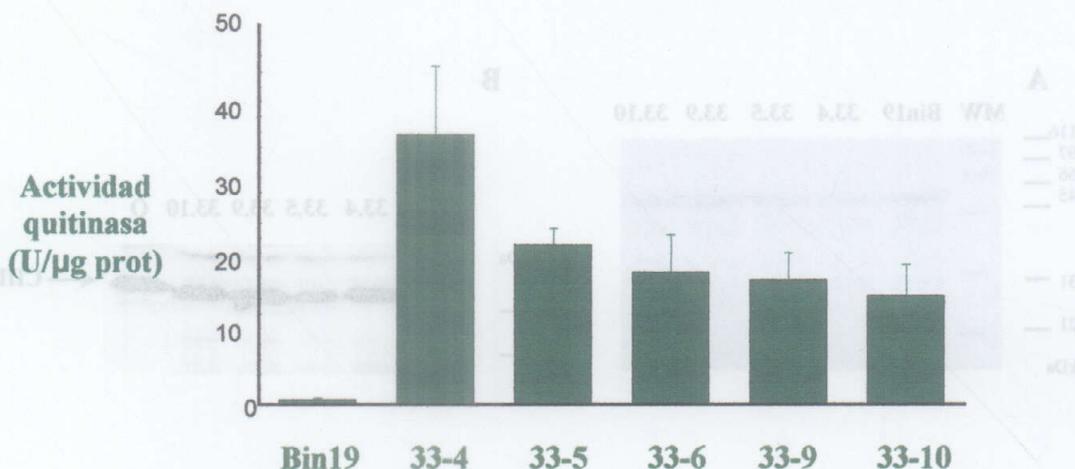


Figura II.10. Actividad quitinasa presente en las diferentes líneas psCHIT33

La actividad quitinasa hallada en las líneas transgénicas que expresan la CHIT33 de *T. harzianum*, superan al menos diez veces la hallada en las líneas control Bin19.

Si se compara la gráfica anterior con las figuras II.8 y II.10, se puede observar que, en líneas generales, la actividad quitinasa se corresponde a la cantidad de RNA mensajero y de proteína expresada, respectivamente. Este hecho ocurría de igual modo en las plantas transgénicas que expresaban la quitinasa CHIT42 de *T. harzianum* (García, 1997, Tesis Doctoral).

2. EXPRESIÓN SIMULTÁNEA DE LAS QUITINASAS CHIT33 Y CHIT42 EN PLANTAS DE TABACO. OBTENCIÓN DE PLANTAS psCHIT33x42

Trabajos previos han demostrado que la expresión simultánea de diferentes proteínas implicadas en el micoparasitismo, puede potenciar la resistencia de una determinada especie frente a enfermedades producidas por hongos fitopatógenos. Tal es el caso de la coexpresión en tabaco de una quitinasa básica de arroz y una glucanasa ácida de alfalfa, que incrementa de forma sinérgica la resistencia frente al patógeno *Cercospora nicotianae* (Zhu *et al.*, 1994).

Se han descrito numerosos casos de sinergismo en diferentes proteínas implicadas en el micoparasitismo. En *Trichoderma harzianum* se ha demostrado sinergia de enzimas hidrolíticas y de éstas con antibióticos y fungicidas de origen químico (Ahmad y Baker, 1987; Monte, 2001). En concreto, las quitinasas CHIT33, CHIT37 y CHIT42 actúan sinérgicamente, *in vitro*, cuando se incuban frente a una suspensión de paredes celulares purificadas de *B. cinerea* (de la Cruz *et al.*, 1992).

Considerando estos resultados, se procedió a obtener plantas transgénicas de tabaco que coexpresaran las quitinasas CHIT33 y CHIT42, con el propósito de determinar la existencia de sinergia entre ambas enzimas y su efecto sobre la resistencia de la planta frente a diversos fitopatógenos.

2.1. POLINIZACIÓN DE PLANTAS psCHIT33. OBTENCIÓN DE LA F₀

Las plantas parentales utilizadas se seleccionaron en base a la actividad quitinasa y la resistencia frente a *R. solani*. Como portadora del gen *chit42*, se escogió la línea psCHIT42.2, que contiene una copia del gen, presenta niveles altos de actividad quitinasa y una resistencia notable al patógeno (García, 1997, Tesis Doctoral).

Como parental portadora del gen *chit33*, se escogió la línea psCHIT33.5, que presentaba una copia del transgen en el genomio (Cubero, 1997, datos no publicados) y un elevado nivel de actividad quitinasa (Figura II.10).

El polen obtenido a partir de las flores de la planta psCHIT33, se recogió para ser depositado posteriormente sobre los pistilos de la planta parental psCHIT42, a la que previamente se les había cortado los estambres, para evitar la posible autofecundación. Tras la deposición del polen, la flor se protegió con una cubierta transparente.

2.2. ANÁLISIS NORTHERN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS

Las semillas obtenidas de la planta parental psCHIT42.2 fecundada con el polen de la línea psCHIT33.5, constituían la F₀ del cruce. Para comprobar si el proceso de cruzamiento se había desarrollado con éxito, se germinaron semillas en medio selectivo con kanamicina (apartado 2.4 de *Materiales y Métodos*). De las plántulas independientes seleccionadas, se obtuvo RNA a partir de las hojas, y se analizó por northern la expresión de ambas quitinasas (Figura II.11). Las plantas que resultaron positivas se seleccionaron para la realización de los ensayos descritos en los apartados 3.1 y 3.2 de este capítulo, así como para la posterior obtención de semillas.

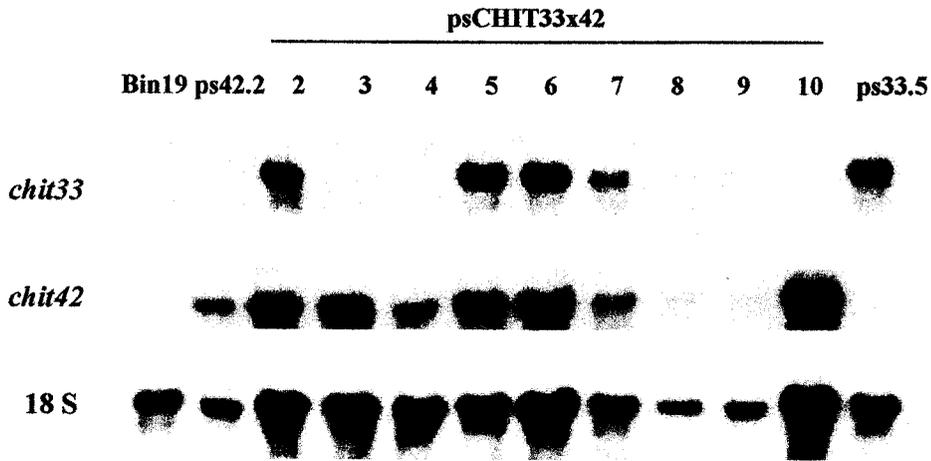


Figura II.11 Northern de las plantas cruce. Como control negativo se utiliza la línea portadora del vector vacío Bin19. Como control positivo para la hibridación con los genes *chit42* y *chit33* de *T. harzianum*, se utilizan las líneas parentales psCHIT42.2 y psCHIT33.5. El control de carga se realiza utilizando como sonda el DNA correspondiente al RNA ribosómico 18 S de rábano.

Como muestra la Figura II.11, no todas las plantas de la F₀ del cruce portan el gen *chit33*. El cruce dihíbrido para dos caracteres presentes en homocigosis y heterocigosis, respectivamente, da lugar a plantas que portan ambas quitinasas y plantas que sólo portan la CHIT42 (procedentes del parental homocigoto), en una proporción genotípica y fenotípica de 1:1.

Los niveles de expresión de las quitinasas en las plantas cruce no se ven afectados con respecto a los parentales. Para el análisis funcional se seleccionaron las líneas psCHIT33x42.2, psCHIT33x42.5, psCHIT33x42.6 y psCHIT33x42.7, que coexpresaban las dos quitinasas.

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS psCHIT42, psCHIT33 Y psCHIT33x42

Como se mencionó en el apartado 4 de la *Introducción II*, se han realizado numerosos estudios con el objetivo de obtener plantas más resistentes a condiciones bióticas y abióticas adversas (Apse & Blumwald, 2002; Garg *et al.*, 2002; Laugé & De Wit, 1998; Roxas *et al.*, 2000; Schützendübel & Polle, 2002; Shi *et al.*, 2003).

Plantas más resistentes a estrés abiótico se han conseguido introduciendo genes homólogos y heterólogos que codifican enzimas hidrolíticas, como quitinasas y glucanasas, entre otras (Alexander *et al.*, 1993; Bolar *et al.*, 2001; Jach *et al.*, 1995; Lorito *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1994); y combinaciones de genes *Avr* y *R* que producen interacciones incompatibles, manteniendo de este modo activados los mecanismos de defensa (Laugé & De Wit, 1998).

La homología existente a nivel de la proteína CHIT33 con otras quitinasas vegetales (Limón *et al.*, 1995), contribuiría a reforzar la batería enzimática de defensa propia de la planta. Sobre la proteína CHIT42, aunque no presenta homología con las

quitinasas vegetales, se propuso en trabajos anteriores que contribuía a la liberación de elicitores en las etapas tempranas de la infección, activando los mecanismos de defensa de la planta (Lorito *et al.*, 1998).

Además de incrementar la batería hidrolítica endógena de la planta, la presencia de enzimas de origen fúngico podría contribuir a la activación de los mecanismos de defensa de ésta. Este hecho ya ha sido descrito en el caso de una xilanasa TvX de *T. viride*; los mecanismos de defensa de la planta se activan debido a una posible interacción de la proteína con un receptor de la célula vegetal, que la reconoce como enzima exógena procedente de otro organismo (Avni *et al.*, 1994; Sharon *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1999).

El reciente descubrimiento de la interconexión entre las rutas de respuesta a estrés biótico y abiótico (Ellis & Turner, 2001; Maleck & Dietrich, 1999; Kizis *et al.*, 2001; Schenk *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002; Zhang & Klessig, 2001; Zhu, 2001), condujo a realizar ensayos de resistencia de distinta naturaleza, utilizando las diferentes líneas transgénicas obtenidas en el laboratorio. En la Tabla II.6, se esquematizan las diferentes líneas transgénicas seleccionadas para realizar el análisis funcional. Cada línea se llevó por duplicado, en el caso de las plantas control se analizaron 4 plantas independientes. Los resultados obtenidos con plantas silvestres de tabaco coinciden con los obtenidos con las plantas transformadas con el plásmido vacío (Bin19), por lo que sólo se refieren estos últimos.

Líneas control	psCHIT42	psCHIT33	psCHIT33x42
Línea silvestre	psCHIT42.1.1	psCHIT33.4.1	psCHIT33x42.2
Bin19.1	psCHIT42.1.2	psCHIT33.4.2	psCHIT33x42.5
Bin19.2	psCHIT42.2.1	psCHIT33.5.1	psCHIT33x42.6
Bin19.3	psCHIT42.2.2	psCHIT33.5.2	psCHIT33x42.7
Bin19.4	psCHIT42.3.1	psCHIT33.9.1	
	psCHIT42.3.2	psCHIT33.9.2	
	psCHIT42.4.1	psCHIT33.10.1	
	psCHIT42.4.2	psCHIT33.10.2	

Tabla II.6. Líneas seleccionadas de plantas psCHIT42, psCHIT33 y psCHIT33x42, para los ensayos de estrés abiótico y biótico

3.1. ENSAYOS DE RESISTENCIA FRENTE A ESTRÉS BIÓTICO

3.1.1. Ensayos de resistencia de germínulas frente al hongo fitopatógeno *R. solani*

El hongo *R. solani* infecta las raíces de las plantas de la familia *Solanaceae*, produciendo la enfermedad denominada podredumbre del cuello de la raíz.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que las plantas portadoras de la quitinasa CHIT42 de *T. harzianum* CECT 2413, son más resistentes al hongo fitopatógeno *R. solani* tanto a nivel de germínula como de planta adulta (García, 1997, Tesis Doctoral; Lorito *et al.*, 1998). Basándonos en estos trabajos, los ensayos se llevaron a cabo como se describe en el apartado 20.3.1 de *Materiales y Métodos*.

La Figura II.12 muestra que el grado de infección y el número de germínulas infectadas por *Rhizoctonia* es mayor en las plantas control que en las líneas transgénicas psCHIT33. La evaluación de los daños se efectuó a los 7 días de incubación con el patógeno. Los datos globales, referidos a los porcentajes de supervivencia, se analizaron estadísticamente con un nivel de significación de $P \leq 0.01$ (Tabla II.7).

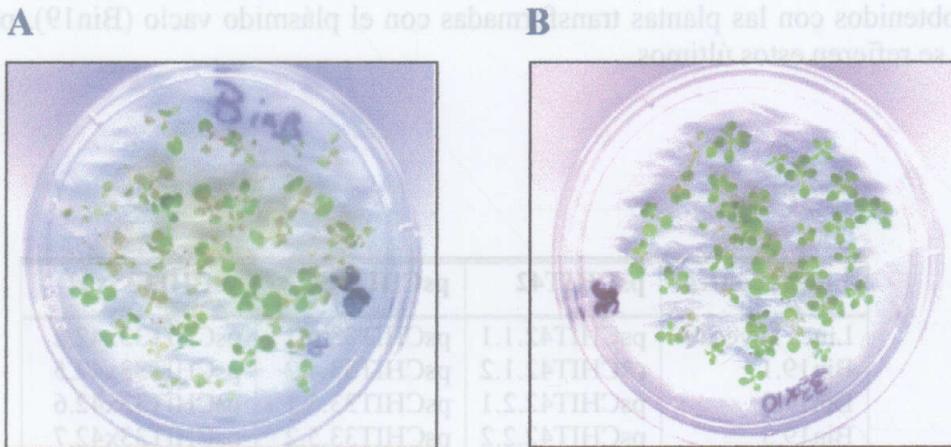


Figura II.12. Efecto generado por *R. solani* en dos líneas transgénicas: A, línea control Bin19, portadora del vector vacío; y B, línea perteneciente a las plantas psCHIT33.

Línea transgénica ensayada	% de supervivencia
Bin19	39.625 ± 3.375
psCHIT42	56.767 ± 8.500
psCHIT33	81.005 ± 1.705
psCHIT33x42	64.580 ± 4.330

Tabla II.7. Porcentaje de supervivencia de las germínulas frente a *R. solani*. Las diferencias significativas se detallan considerando un nivel de significación de $P \leq 0.01$.

Como muestra la Tabla II.7, las líneas transgénicas portadoras de la quitinasa CHIT33 de *T. harzianum* presentan un mayor porcentaje de supervivencia frente al fitopatógeno *R. solani* que las plantas control. Los porcentajes de supervivencia obtenidos con las germínulas psCHIT42 coinciden con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (García, 1997, Tesis Doctoral).

Las plantas psCHIT33 presentan mayor tasa de supervivencia, seguida de las plantas psCHIT42. Las plantas cruce, psCHIT33x42, muestran una tasa de supervivencia intermedia, indicando que estas quitinasas no actúan sinérgicamente en la planta, en contraposición al efecto descrito en los ensayos *in vitro* (de la Cruz *et al.*, 1992). A diferencia de otros casos en los que se ha mostrado una mayor resistencia al coexpresar enzimas que intervienen en el micoparasitismo (Bolar *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1994), estos resultados indican que la presencia de la quitinasa CHIT42 influye negativamente sobre el efecto producido por la CHIT33, probablemente debido a competencia por algún sustrato ente ambas enzimas que limita su actividad.

3.1.2. Ensayos de resistencia de plantas adultas frente a la bacteria fitopatógena *P. syringae* pv *tabaci*

El incremento en las tasas de supervivencia frente a *R. solani*, concuerda con los resultados obtenidos al introducir genes de quitinasas de *Trichoderma* en plantas de tabaco, patata y fresa (Lorito *et al.*, 1998; Yubero-Serrano *et al.*, 2002).

Los estudios realizados con plantas transgénicas psCHIT42 de tabaco, mostraron la ausencia de correlación entre los niveles de actividad enzimática y la mayor o menor resistencia de la planta frente al patógeno *R. solani* (García, 1997, Tesis Doctoral). La hipótesis propuesta para explicar estos resultados fue la liberación de elicitores, por la actividad quitinasa, a partir de las paredes celulares del organismo invasor en las etapas tempranas de la infección (Lorito *et al.*, 1998).

El hecho de que algunas líneas transgénicas no infectadas por patógenos presentaran niveles elevados de expresión de genes PR, como PR1a y PR3, sugería una mayor resistencia basal a las infecciones potenciales. Este suceso, apoyado por la interconexión existente entre las distintas rutas de respuesta a patógeno (Maleck & Dietrich, 1999; Singh *et al.*, 2002), condujo a plantear si el tabaco portador de las quitinasas era igualmente resistente a fitopatógenos de distinta naturaleza.

La mayor resistencia de las plantas transgénicas psCHIT33, psCHIT42 y psCHIT33x42, podría deberse a una activación de los mecanismos de respuesta a estrés general más que a la actividad enzimática de las hidrolasas. Podrían mostrar, por tanto, mayor tolerancia y resistencia a patógenos de diversa naturaleza, como la bacteria *P. syringae* pv *tabaci*, carente de quitina, así como a otros tipos de estrés.

La bacteria fitopatógena *P. syringae* pv *tabaci*, provoca la aparición de la respuesta hipersensible en el tabaco y, por consiguiente, la formación de tejido necrosado. Numerosos trabajos describen ensayos de resistencia a patógenos inoculados en plantas mejoradas genéticamente (Alonso *et al.*, 1995; Miguel *et al.*, 2000). En nuestro caso, se planteó el siguiente modelo experimental para analizar funcionalmente las diferentes líneas portadoras de las quitinasas (Figura II.13).

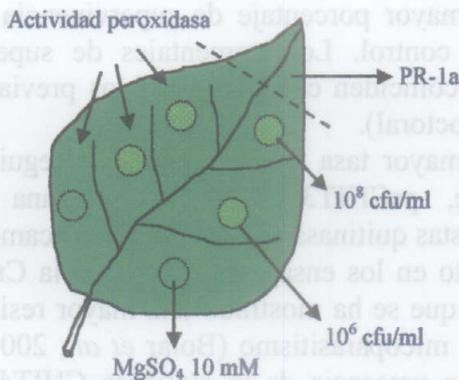


Figura II.13. Diseño experimental realizado en las plantas de tabaco frente a *P. syringae* pv *tabaci*

Como se describe en el apartado 20.1 de *Materiales y Métodos*, las plantas seleccionadas se inocularon con dos concentraciones diferentes del patógeno, 10^6 y 10^8 cfu/ml, siendo esta última la que originaba una respuesta hipersensible clara en la hoja. Como control se inyectó el tampón en el que se prepararon las distintas soluciones de bacterias (10 mM de $MgSO_4$). Se tomaron muestras antes de inocular y transcurridas 24 y 48 h después de la inoculación del patógeno. Los discos de hojas obtenidos a partir de las zonas de infección se utilizaron para analizar el tiempo de permanencia del patógeno en la planta y la actividad peroxidasa presente en el tejido vegetal (apartados 20.2 y 17.4 de *Materiales y Métodos*). El extremo de la hoja se utilizó para la obtención de mRNA y el análisis de la expresión de diferentes genes PR. De igual modo, se realizó un seguimiento de la formación del área necrótica en la zona de inyección del patógeno.

Sólo el inóculo con la concentración más elevada de patógeno provocó el desarrollo de la respuesta hipersensible en la planta, por lo que se hace referencia únicamente a esa condición en el análisis funcional descrito a continuación.

3.1.2.1. Permanencia del patógeno en la planta

Previamente a la infección con *Pseudomonas*, se analizó la existencia de otros microorganismos en el tejido foliar (apartado 20.2 de *Materiales y Métodos*). En la Figura II.14 se puede comprobar la ausencia de estos.

El margen de error obtenido en los recuentos a 24 h no permite afirmar categóricamente que las líneas transgénicas respondan mejor que las plantas control, aunque los niveles medios parecen indicar que las plantas psCHIT42 y las cruce presentan una permanencia del patógeno por debajo de las plantas control Bin19. Aunque el error existente a 48 h también resulte elevado, sí se halla una diferencia significativa con respecto a las plantas control, fundamentalmente en las plantas psCHIT33x42.

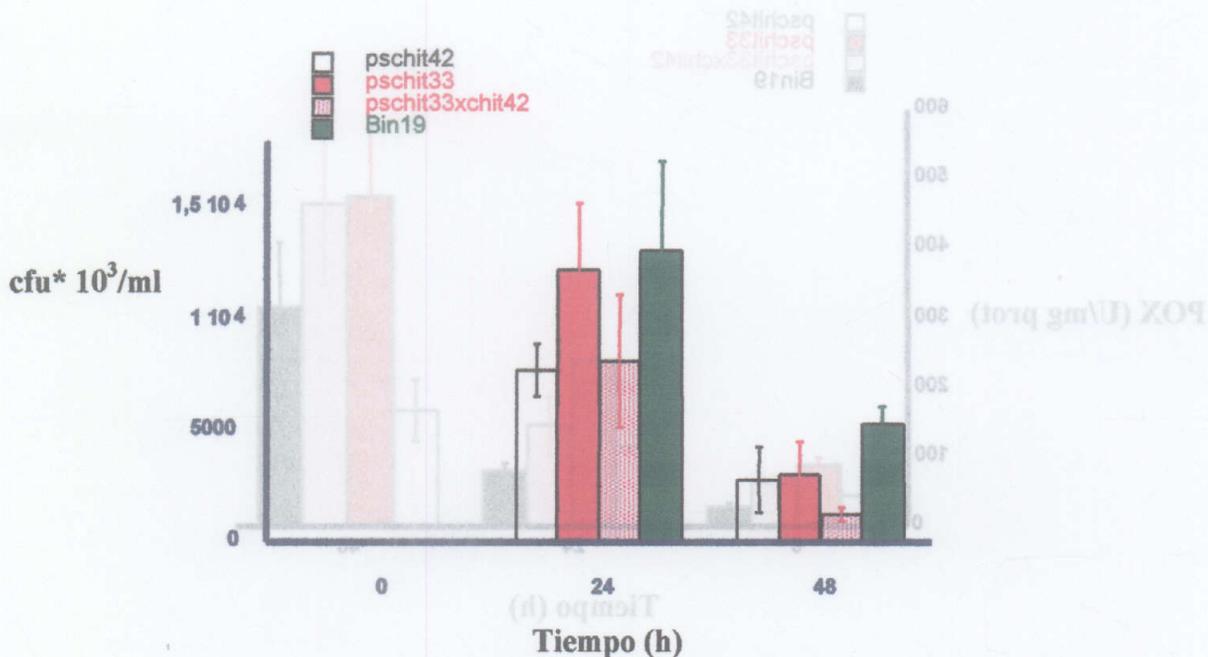


Figura II.14. Permanencia de *P. syringae* pv *tabaci* en el tejido foliar. La permanencia se estudia con respecto al inóculo de concentración 10^8 cfu/ml.

La variabilidad probablemente se deba a la diferencia entre los grados de necrosis presente en las distintas muestras analizadas de la misma línea, lo que puede afectar a la viabilidad del patógeno.

3.1.2.2. Cinética de la actividad peroxidasa

Los niveles de actividad peroxidasa medidos corresponden a enzimas implicadas en el reforzamiento de la pared celular de la planta (apartados 2.1.2.3 y 2.1.4 de *Introducción II*), que pueden utilizar el guayacol como donador de electrones (revisado por Hammond-Kosack & Jones, 1996; Mittler *et al.*, 1999a; Yoshida *et al.*, 2003).

En primer lugar se analizó la actividad basal, previa a la infección, de las distintas líneas transgénicas y se comprobó que presentaban niveles significativamente superiores al los encontrados en las plantas Bin19 (Figura II.15). Este resultado sugiere que la planta se halla en un estado de mayor alerta al mantener activo uno de sus mecanismos de defensa, como es el reforzamiento de la pared celular, lo cual supone un incremento en la barrera física para la entrada de patógenos.

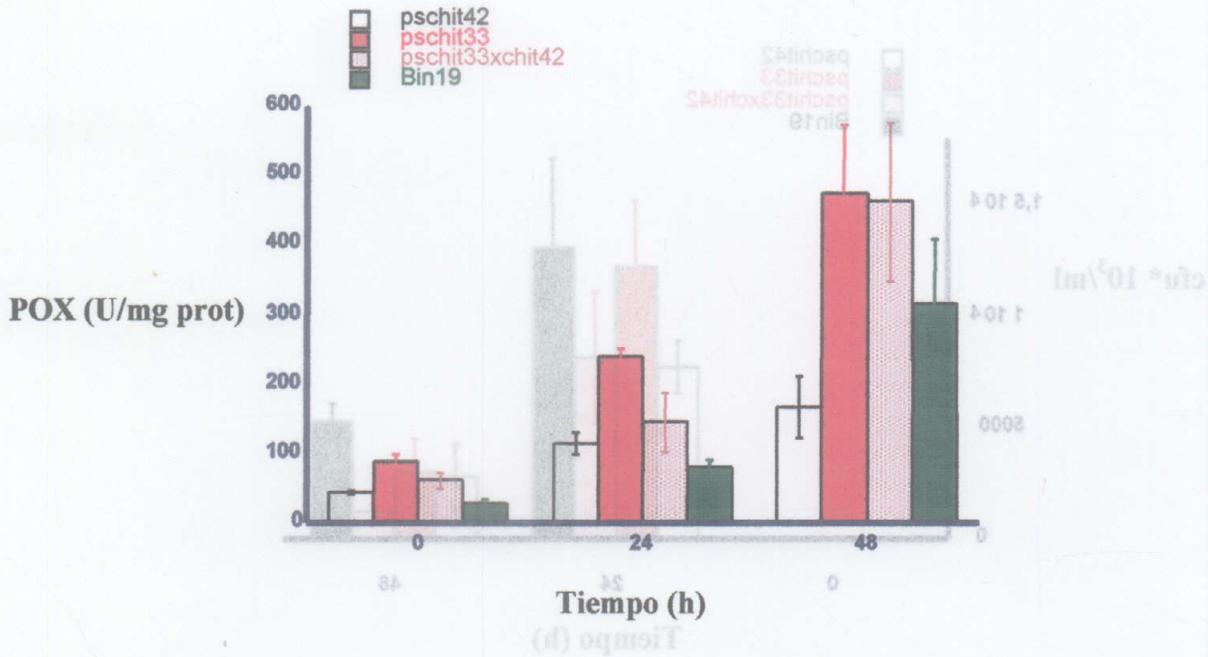


Figura IL15. Cinética de la actividad peroxidasa de las líneas psCHIT33, psCHIT42, psCHIT33x42 y Bin19

Los niveles basales de actividad peroxidasa son más elevados en las plantas transgénicas que en las control, lo cual podría conferir mayor resistencia frente a un estrés biótico e incluso abiótico. Al cabo de las 24 h se mantienen las diferencias de actividad entre las distintas líneas transgénicas, pero a 48 horas, los niveles aumentan y dejan de ser significativamente diferentes. Entre las diferencias detectadas cabe señalar que los niveles de actividad peroxidasa más elevados corresponden a las plantas psCHIT33, lo que explicaría su mayor resistencia frente a los patógenos ensayados (Tabla II.7). La variabilidad existente en el último punto de la cinética (48h) probablemente se deba, de nuevo, al estado necrosado del tejido, que puede alterar la integridad de las proteínas y por consiguiente la cuantificación efectuada para la realización de los ensayos enzimáticos.

Los resultados sugieren que el poseer un nivel basal de actividad enzimática superior al control, puede ser un factor importante en la mejora de la respuesta por parte de la planta.

Resulta de interés el análisis de aquellos marcadores implicados en la defensa que son regulados por el ácido salicílico. Éste constituye un mensajero esencial en la respuesta a patógenos y está estrechamente relacionado con el incremento de la producción de formas ROS, ya que inhibe a las enzimas que intervienen en la detoxificación de éstas (Bi *et al.*, 1995; Durner & Klessig, 1995; Mittler *et al.*, 1999b; Takahasi *et al.*, 1997). Cabe destacar que el SA no ejerce un efecto inhibitorio sobre las guayacol peroxidadas o peroxidadas aniónicas, como ya se mencionó con anterioridad (apartado 2.1.2.2 de *Introducción II*; Durner & Klessig, 1995). Las peroxidadas son, entre otras, las enzimas encargadas de detoxificar las formas reactivas de oxígeno o formas ROS, que se originan tras un daño biótico y abiótico en la planta (Yoshida *et al.*, 2003; apartado 2.1.4 de *Introducción II*). Hasta el momento, la manipulación de las formas ROS ha constituido uno de los frentes abarcados en la mejora genética de plantas en los programas de biocontrol (Amaya *et al.*, 1999; Roxas *et al.*, 2000; Veena

et al., 1999; Yun *et al.*, 2000). De hecho, la presencia de niveles subletales de formas activas de oxígeno resulta en una mejora en la resistencia del tabaco ante un estrés biótico (Chamnonpol *et al.*, 1998).

3.1.2.3. Expresión de genes de respuesta a patógeno (PR)

Los mecanismos de defensa frente a patógenos implican la síntesis de ácido salicílico y su actuación como molécula mensajera (Klessig *et al.*, 2000). El SA contribuye indirectamente al reforzamiento de las barreras físicas de entrada de patógenos en la planta, al no inhibir a las enzimas responsables de tal reforzamiento e incrementar la concentración de determinadas formas ROS, que sirven de sustrato para los procesos de lignificación (Bi *et al.*, 1995; Durner & Klessig, 1995; Mittler *et al.*, 1999b; Takahasi *et al.*, 1997). Además, el SA ejerce un efecto regulador sobre la expresión génica al activar genes, entre ellos los que codifican proteínas PR (Apartado 2.1.2.5 de *Introducción II*; Park *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002).

Por ello, se ha analizado la expresión basal de algunos de los genes que codifican estas proteínas PR, así como su cinética a lo largo del desarrollo de la respuesta hipersensible (Figura II.16). Uno de los marcadores más utilizados por su alta expresión tras la infección de un patógeno es la proteína PR-1a, cuya función se desconoce hasta el momento (Buchel *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Maleck & Dietrich, 1999).

Algunas de las plantas analizadas muestran niveles basales de PR1a considerables, como la línea psCHIT33.10 y las líneas cruce psCHIT33x42.5 y psCHIT33x42.7. Hay que resaltar que estas mismas líneas presentaban también mayores niveles basales de actividad peroxidasa (Figura II.15). Las líneas portadoras de ambas quitinasas presentan niveles basales de expresión elevados con respecto a las parentales, lo que sugiere que quizás la coexpresión de las quitinasas esté estresando excesivamente a la planta, aunque esta no presente cambios morfológicos ni en el patrón de crecimiento vegetativo; ni muestre una respuesta significativamente mejorada frente a los fitopatógenos usados, probablemente por que el sistema de defensa se halle saturado en la planta o porque exista competencia entre las dos enzimas.

A las 48 h la expresión de PR1a es tan fuerte como la inducida con una solución de salicílico aplicada directamente a través del pecíolo (SP). La cinética de acumulación del mRNA de PR1a de las plantas transgénicas es más rápida que la presentada por las plantas control Bin19. Este nuevo resultado apoyaría los datos relativos a los porcentajes de supervivencia frente a *R. solani* obtenidos en las plantas transgénicas respecto a las plantas control (Tabla II.7).

Se analizó asimismo la expresión de los genes PR-3 y PR-5, que codifican una quitinasa con actividad antifúngica y una osmotina respectivamente, y el gen de una peroxidasa acídica (Stintzi *et al.*, 1993). Los niveles basales de expresión del gen correspondiente a la peroxidasa eran elevados tanto en plantas transgénicas como en plantas control no infectadas (Figura II.16), hecho descrito anteriormente para la PR-2 y la PR-5 en *Arabidopsis* (Maleck & Dietrich, 1999). No se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes correspondientes a las PR-3 y PR-5 con respecto a las líneas control Bin19 (Figura II.16).

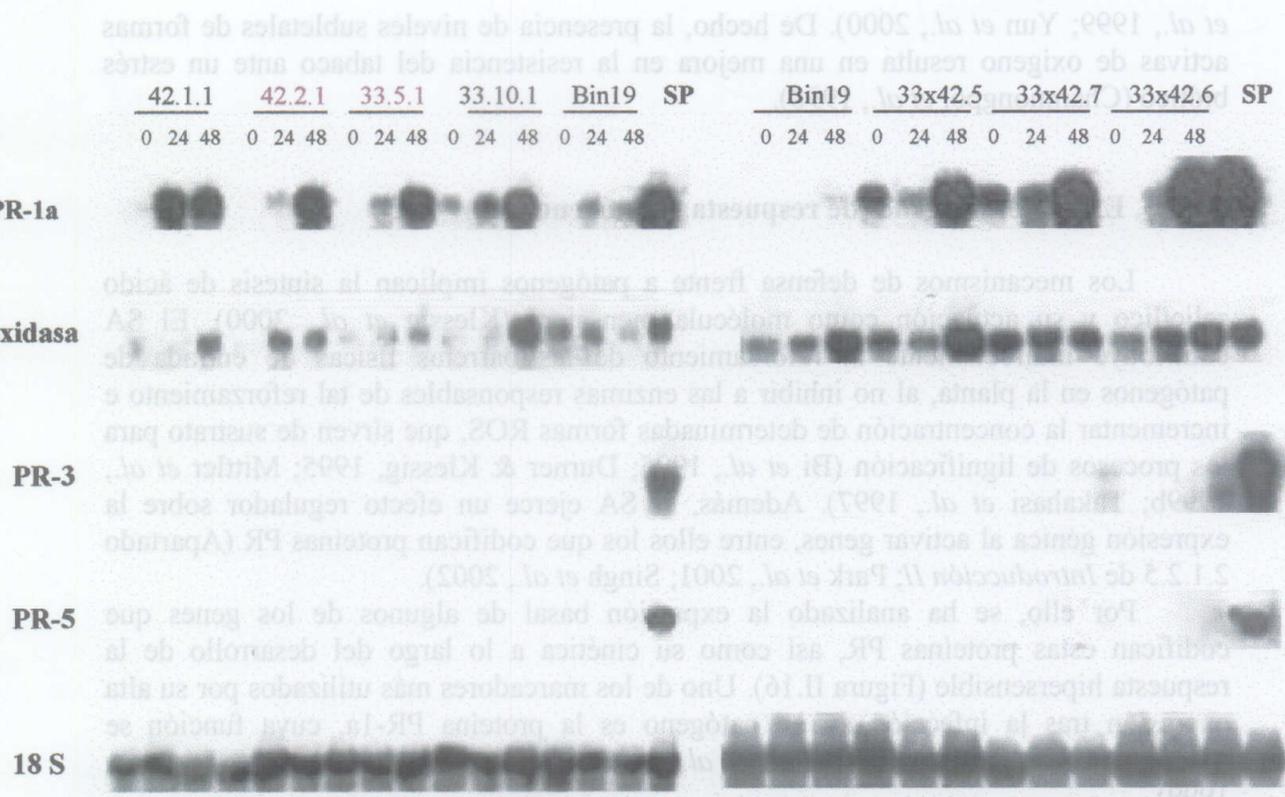


Figura II.16. Cinética de la expresión de los genes correspondientes a las proteínas PR. Las muestras analizadas se extrajeron a partir de hojas de tabaco a distintos tiempos: 0 h, que se refiere al momento previo a la infección con el patógeno; y 24 y 48 h, posteriores a la inoculación de *P. syringae* pv *tabaci*. Las muestras procedían de distintas líneas transgénicas portadoras de la CHIT42 y de la CHIT33 de *T. harzianum* CECT 2413: psCHIT42.1.1; psCHIT42.2.1 y psCHIT33.5.1, destacadas en color rosa por ser los parentales utilizados en la obtención de las plantas cruce; y psCHIT33.10.1. A la derecha se muestra la cinética de las líneas cruce, seleccionadas para el análisis funcional, portadoras de las dos quitinasas de *Trichoderma*: psCHIT33x42.5, psCHIT33x42.6 y psCHIT33x42.7. Como control negativo se emplea la línea portadora del vector vacío, Bin19. Como control positivo se incluye una muestra procedente de hojas de tabaco tratadas con SA, a nivel del pecíolo (SP). Las sondas utilizadas fueron las correspondientes a los genes que codifican para las proteínas PR-1a, peroxidasa, PR-3 (quitinasa de tabaco) y PR-5 (osmotina) [Novartis]. La carga se cuantificó hibridando las muestras con el DNA correspondiente al RNA 18 S de rábano.

3.1.2.4. Desarrollo del área necrótica en la zona de infección

El área necrótica generada en la respuesta hipersensible responde a un programa de muerte celular distinto al que ocurre en la senescencia (Bonas & Lahaye, 2002; Pontier *et al.*, 1999); el hecho de que algunas moléculas marcadoras participen en ambos procesos, indica la posible interconexión entre sus rutas de señalización (Tronchet *et al.*, 2001). Las células que entran en el programa de muerte celular correspondiente a la HR, parecen emitir señales a las células vecinas que provocan su

senescencia, constituyendo probablemente una segunda barrera que entorpece la entrada del patógeno al tejido colindante (Pontier *et al.*, 1999).

La aparición de la mancha necrótica se desarrolla rápidamente alrededor del sitio de infección, pues la activación de los mecanismos que la desencadenan se da en cuestión de horas (Bolwell *et al.*, 2002; Hüchelhoven & Kogel, 2003).

En la Figura II.17 se muestra la formación del área necrótica característica de la HR en las distintas líneas transgénicas. Claramente se aprecia que el desarrollo de la necrosis en las plantas portadoras de las quitinasas de *T. harzianum* es considerablemente menor que el detectado en las plantas Bin19. Este resultado concuerda con los niveles basales y la cinética correspondiente a la actividad peroxidasa detectados en las plantas transgénicas con respecto a las control (Figura II.15). El mantener activo el reforzamiento de la pared celular de forma previa a la infección y el inducirse de forma más rápida tras la infección, supone una dificultad mayor para la entrada y desarrollo del patógeno.

Las líneas portadoras de las quitinasas presentan un comportamiento más resistente frente a los fitopatógenos analizados, gracias a que cuentan con mecanismos de defensa que se hallan activados de forma previa a la infección. Por un lado se obstaculiza la entrada y la posterior propagación del patógeno, gracias al reforzamiento activo de la pared celular vegetal generado por las peroxidases, cuyos niveles basales son más elevados y cuya cinética de inducción resulta superior a la de los controles (Figura II.15). Por otro, se responde de forma más rápida que el control a otros mecanismos implicados en defensa, como la síntesis de proteínas PR-1a (Figura II.16).



Figura II.17. Desarrollo del área necrótica típica de la respuesta hipersensible en tabaco por el patógeno *P. syringae* pv *tabaci*. Las imágenes mostradas corresponden a 48 h después de la inoculación del patógeno en la hoja.

3.2. ENSAYOS DE RESISTENCIA A ESTRÉS ABIÓTICO

3.2.1. Ensayos de resistencia a estrés salino

El daño generado por el estrés salino es el sumatorio de los efectos provocados por la alteración del equilibrio osmótico celular, la toxicidad iónica y la interferencia en el transporte iónico con la consiguiente limitación de la disponibilidad de otros iones, especialmente el K^+ (Apartado 2.2.2 de *Introducción II*; Serrano & Rodríguez Navarro, 2001; Zhu, 2001a). Además, el estrés salino produce un daño oxidativo que genera formas activas de oxígeno. La producción de formas ROS constituye uno de los efectos más comunes causados por el estrés abiótico en las plantas (Polle & Renneberg, 1993; Venisse *et al.*, 2001).

La presencia de niveles altos de actividad peroxidasa en las líneas transgénicas de tabaco que sobreexpresan los genes *chit42* y *chit33* de *T. harzianum*, sugiere que la capacidad de detoxificación de las formas ROS podría estar potenciada en estas plantas (Figura II.15, Figura II.16). Estas líneas presentan además niveles elevados de expresión de proteínas de respuesta a patógeno, como la PR-1a (Figura II.16), cuyo patrón indica que los mecanismos de defensa se hallan activos en la planta no infectada y que la respuesta frente al patógeno es más rápida.

Estos resultados condujeron a analizar la respuesta frente a estreses abióticos teniendo en cuenta la interconexión de rutas de transducción de señales entre los distintos tipos de estreses (Ellis & Turner, 2001; Maleck & Dietrich, 1999; Schenk *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002).

Para comprobar si las líneas transgénicas portadoras de las quitinasas de *T. harzianum* presentaban mayor tolerancia frente al estrés salino y osmótico, se realizaron ensayos de resistencia *in vitro* frente a una concentración elevada de NaCl (256 mM), testada para el tabaco previamente en nuestro laboratorio (Luna, 1995, Tesis Doctoral); y a las concentraciones 400 mM y 800 mM de sorbitol, que es un agente promotor de estrés osmótico. Los ensayos se efectuaron en base a trabajos previos, que analizaban la tolerancia de plantas mejoradas genéticamente, mediante la expresión de marcadores específicos de esta respuesta y la valoración de los daños causados (Hoyos & Zhang, 2000; Veena *et al.*, 1999).

Las germínulas de las líneas transgénicas psCHIT33, psCHIT42 y psCHIT33x42 se dispusieron sobre un medio con agarosa-NaCl y agarosa-sorbitol, tal y como se describe en el apartado 20.3.2 de *Materiales y Métodos*. La evaluación de los daños bajo estas condiciones se realizó a la semana del cultivo *in vitro*. Respecto al sorbitol, las concentraciones utilizadas no fueron adecuadas para estos ensayos, ya que la concentración 400 mM no afectaba el crecimiento de las plántulas, o bien la concentración mayor de 800 mM afectaba dramáticamente a todas ellas. Por ello, se habrán de considerar concentraciones intermedias para la puesta a punto de ensayos futuros.

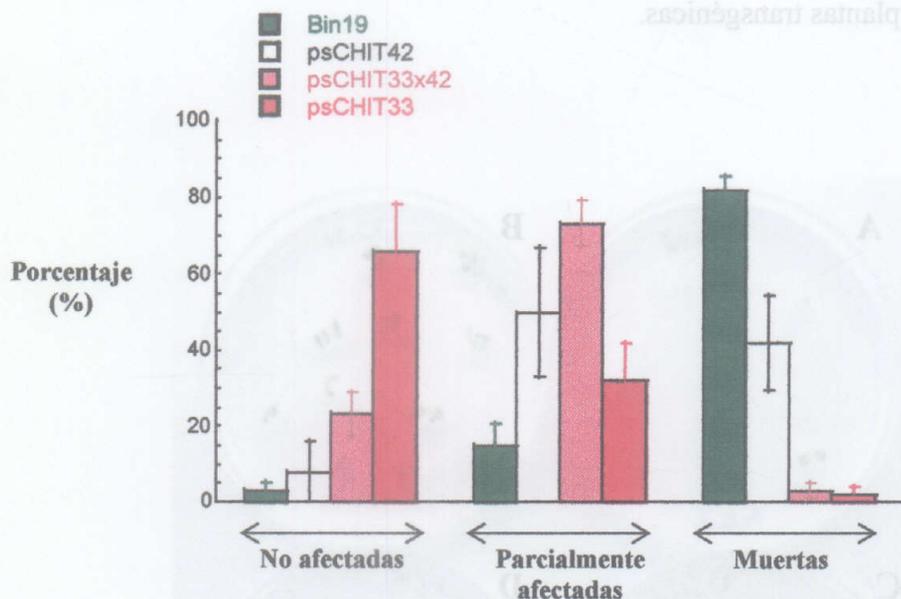


Figura II.18. Daño generado por el estrés salino (256 mM de NaCl) sobre las germínulas de las plantas psCHIT33, psCHIT42, psCHIT33x42 y plantas control Bin19

En la resistencia frente al estrés salino, existen diferencias significativas (nivel de significación $P \leq 0.05$) en cuanto a la tasa de mortandad de las plantas Bin19 con respecto a cada una de las líneas transgénicas portadoras de las quitinasas (Figura II.18). Las plantas cruce presentan un patrón de comportamiento similar al de las plantas psCHIT33, pues presentan un 3.3% y un 2.0% de mortandad, respectivamente, frente al 81.6% que muestran las plantas control. Las plantas psCHIT42 presentan un 42.0% de germínulas muertas, por lo que son las que menos reducen el daño con respecto a las plantas Bin19.

En cuanto a la tasa de supervivencia, las plantas psCHIT33 y las psCHIT33x42 muestran una diferencia clara con respecto a las control y las psCHIT42. La tolerancia mayor, corresponde a las plantas psCHIT33, lo que concuerda con la resistencia presentada frente a *Rhizoctonia* (Tabla II.7), con un 66.0% de germínulas sanas frente a un 3.3% de las líneas Bin19. Las plantas psCHIT33 mostraban, niveles basales de actividad peroxidasa mayores a los hallados en las plantas control Bin19 (Figura II.15), lo que podría permitirles utilizar dinámicamente las formas ROS, generadas en este tipo de estrés, en la lignificación de la pared celular vegetal, contribuyendo la eliminación de éstas (Mittler, 2002).

En el grupo de las plantas parcialmente afectadas, que muestran daño en uno o en ambos cotiledones sin llegar a la muerte de la germínula, las psCHIT33x42 son las que muestran mayor representación.

Se podría concluir que las plantas psCHIT33 son las que toleran mejor el estrés salino *in vitro*, puesto que muestran la mayor tasa de supervivencia, junto a una tasa muy baja de mortandad, que se puede equiparar a la de las plantas cruce. Las psCHIT33x42, en cambio, no presentan un porcentaje de supervivencia tan elevado como las psCHIT33, pero son las que mejor toleran de forma media la presencia de sal. Las plantas psCHIT42 son más resistentes al estrés salino que las plantas control pero el porcentaje de supervivencia es menor que el de las plantas psCHIT33 y psCHIT33x42.

La Figura II.19, muestra el resultado de la supervivencia frente al estrés salino, de las diferentes plantas transgénicas.

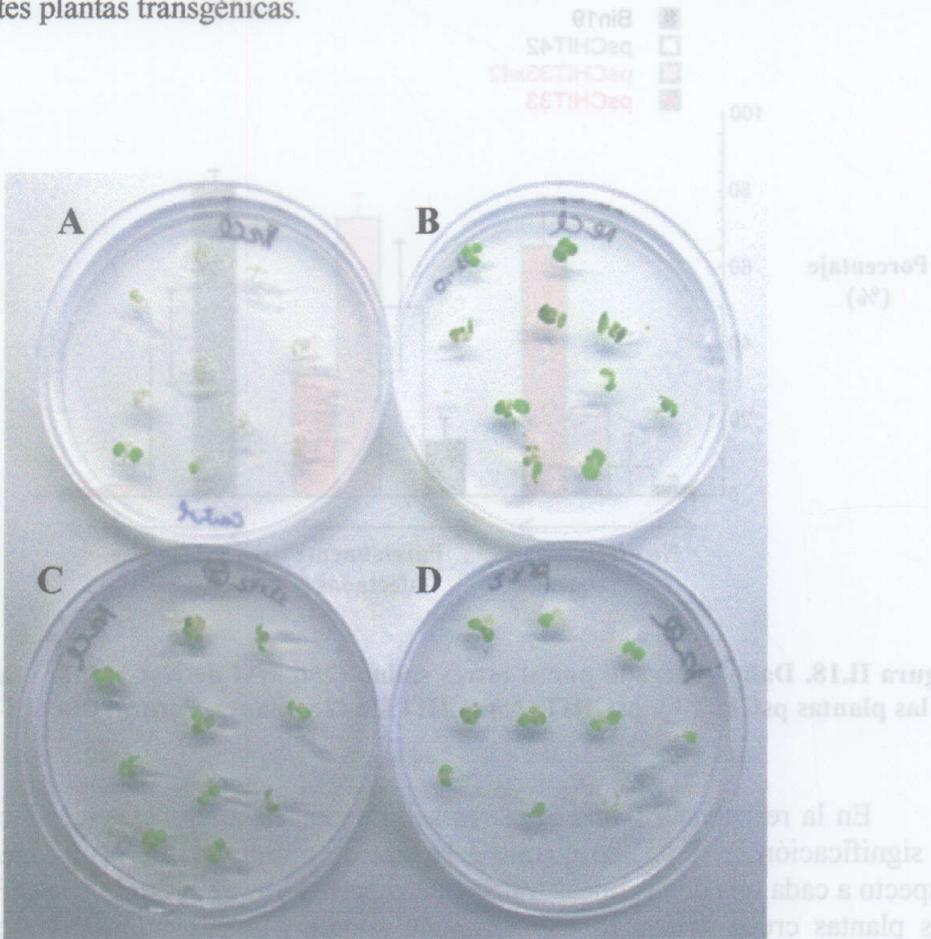


Figura II.19. Ensayo de resistencia frente al estrés salino. La figura muestra el efecto del estrés salino (256 mM de NaCl), sobre las germinulas de las plantas transgénicas de tabaco. La evaluación de los daños se efectuó a los 7 días de incubación. Las plántulas pertenecen a las líneas: **A**, control Bin19; **B** psCHIT33.10.1; **C**, psCHIT33x42.2; y **D**, psCHIT42.2.1.

Los resultados muestran un cierto paralelismo con los obtenidos en los ensayos de estrés biótico, Figura II.15 (actividad peroxidasa) y Tabla II.7 (supervivencia frente a *R. solani*). La mayor tolerancia al estrés salino de las plantas transgénicas, refuerza y apoya los estudios previos que demuestran la interconexión entre las rutas de respuesta al estrés biótico y abiótico, y entre los diferentes tipos de estrés de tipo biótico entre sí (Maleck & Dietrich, 1999; Singh *et al.*, 2002).

El hecho de que las plantas psCHIT33 presenten mayor tolerancia a los estreses ensayados que el resto de las líneas transgénicas, sugiere que la homología de la proteína CHIT33 con las quitinasas vegetales pueda ejercer un efecto positivo sobre los mecanismos de defensa de la planta, además de ser reconocida como molécula de origen fúngico que elicitte una respuesta, como podría ocurrir en el caso de la CHIT42.

La tolerancia de las plantas transgénicas a daños de diferente naturaleza, sugiere que el mecanismo de activación y de acción ejercido por estas quitinasas se halla en las primeras etapas de la ruta de transducción de señales, tras las que se activan los diferentes mecanismos de respuesta a estrés.

Los resultados obtenidos en las líneas cruce manifiestan de nuevo la ausencia de un efecto sinérgico entre las dos quitinasas en la planta, aunque cuenten con tasas de supervivencia más próximas a las del parental portador de la CHIT33 (Figura II.19). La coexpresión de ambas enzimas probablemente genere una competencia entre ambas

3.2.2. Ensayos de resistencia a metales pesados

Como se mencionó en el apartado 2.2.1 de la *Introducción II*, el estrés generado por los metales pesados produce principalmente un daño oxidativo en la célula, debido a un incremento de las formas activas de oxígeno, produciendo, entre otros, daños genotóxicos y modificaciones de grupos funcionales de las proteínas, afectando a la estructura de éstas (Briat & Lebrun, 1999; Schützendübel & Polle, 2002).

La célula cuenta con mecanismos naturales de detoxificación que van desde la eliminación de las formas ROS, presentes en el estrés biótico y abiótico (Venisse *et al.*, 2001), hasta el almacenamiento y compartimentación de los metales (Harrison *et al.*, 1996; Tabata *et al.*, 1997; Wink, 1993). Las peroxidasas y las catalasas son las enzimas encargadas de la reducción del estrés oxidativo en la célula (apartado 2.1.2.2 y 2.1.4 de *Introducción II*; Yoshida *et al.*, 2003).

Las plantas transgénicas portadoras de las quitinasas de *Trichoderma* presentan niveles elevados de actividad peroxidasa y una cinética de inducción más pronunciada que las plantas control (Figura II.15), lo que sugiere una mayor tolerancia al daño tóxico generado por la respuesta hipersensible ante la presencia de un patógeno, o al generado por estrés abiótico, como el salino o el producido por los metales pesados.

Estas plantas transgénicas podrían presentar mayor tolerancia a daños de diversa naturaleza, ya que muestran activos marcadores, que son importantes en el desarrollo de la HR y en la detoxificación de formas ROS (Apartados 3.1 y 3.2.1 de *Resultados II*). Para confirmar esta hipótesis, se efectuaron ensayos de resistencia frente a los metales cadmio y cobre, como se describe en el apartado 20.3.2 de *Materiales y Métodos*; teniendo en cuenta las condiciones puestas a punto en trabajos previos (Berna & Bernier, 1999; Oberschall *et al.*, 2000; Veena *et al.*, 1999).

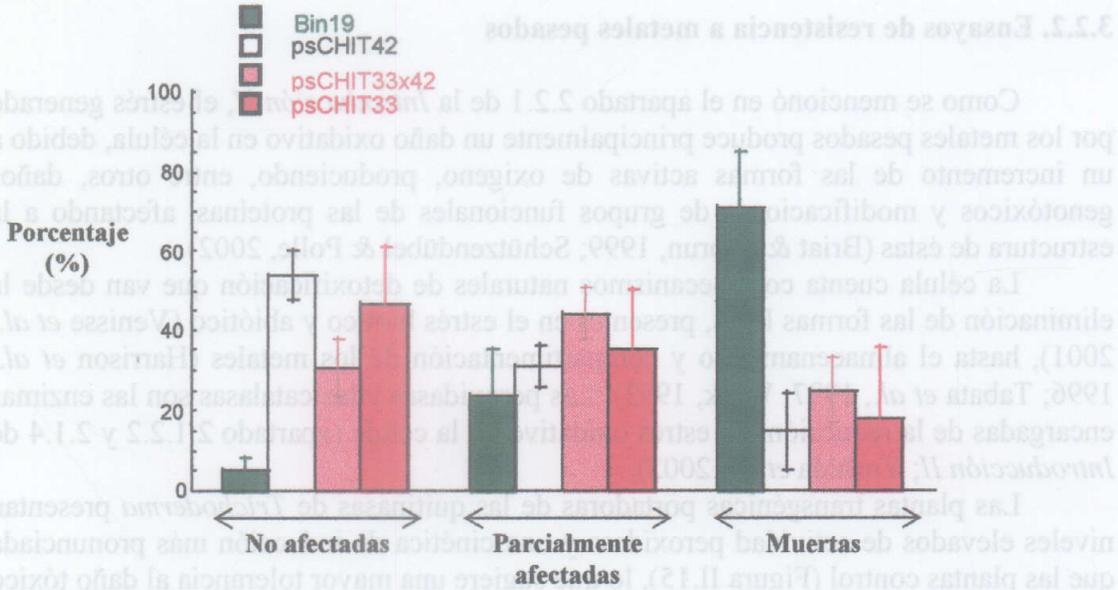
La evaluación de los daños se llevó a cabo de forma similar a la del estrés salino. Se determinó el porcentaje de supervivencia de la plántula, distinguiendo por una parte las que no presentaban ningún daño; las parcialmente dañadas, que presentaban daños en uno de los cotiledones o en los dos; y las totalmente dañadas o muertas, que presentaban maceración, clorosis o necrosis de los tejidos en la plántula completa (Figura II.20).

En los ensayos frente al cadmio (Figura II.20A), hay diferencias significativas ($P \leq 0.05$) tanto en el porcentaje de germinulas muertas de las plantas control respecto a cada una de las líneas portadoras de las quitinasas, por un lado; y, por otro, en el porcentaje de germinulas totalmente sanas de las plantas control con respecto a las plantas psCHIT33, psCHIT42 y psCHIT33x42. Las plantas BinB, muestran un valor medio de mortandad del 71.2 %, frente a un 15.0 % hallado en las plantas psCHIT42, un 18.0% en las plantas psCHIT33 y un 25.0% en las plantas cruce. No se puede, en cambio, establecer una diferencia entre las diferentes plantas transgénicas.

Las plantas Bin19 muestran, asimismo, diferencias significativas con respecto a la supervivencia del resto de germinulas. El valor medio de las plantas psCHIT42, las

sitúa en las de mayor supervivencia, con un 53.7% frente al 5.0% hallado en las plantas control.

A



B

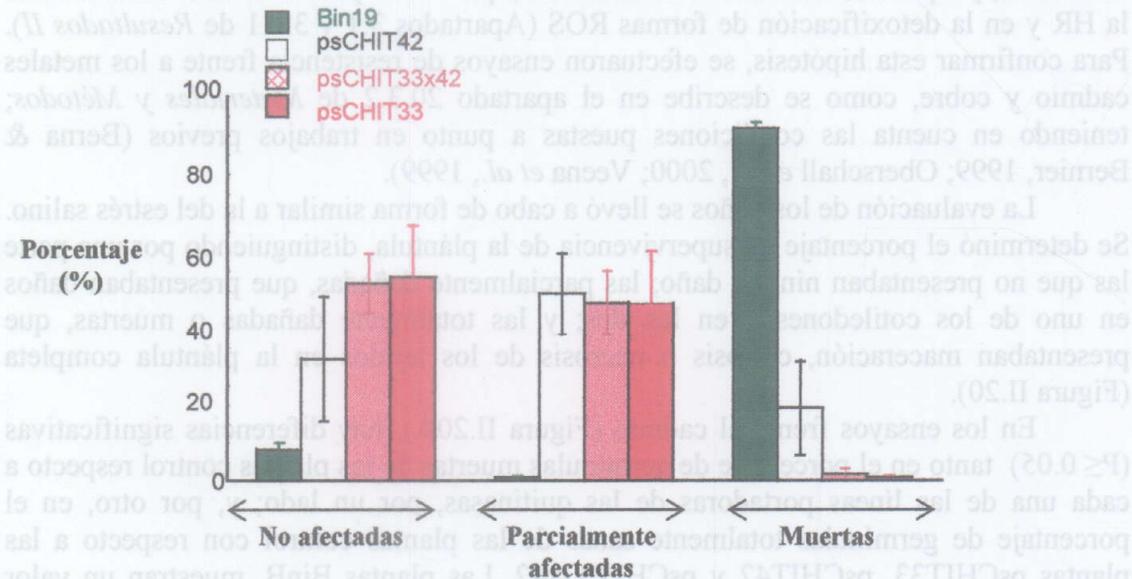


Figura II.20. Daño generado por metales pesados (300 µM) sobre las germinulas de tabaco portadoras de las quitinasas y control (Bin19). A, efecto generado por el cadmio. B, efecto generado por el cobre.

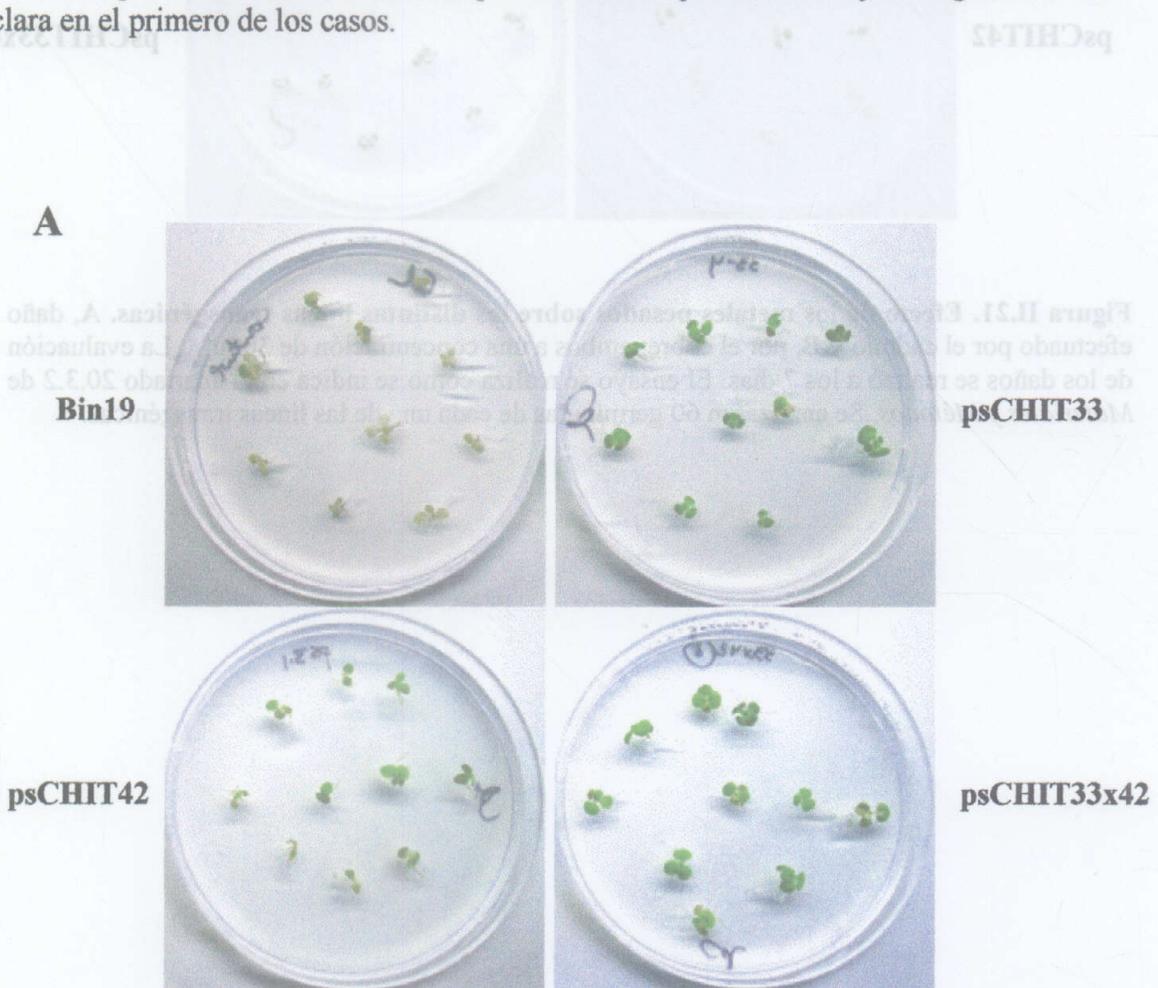
Respecto al cobre (Figura II.20B), las diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las plantas control y el resto de líneas pueden establecerse entre los porcentajes de mortandad, los de daño parcial y los de supervivencia.

Las plantas Bin19 presentan una tasa de mortandad del 91.6%, frente al 19.0% que presentan las plantas psCHIT42, al 1.6% que presentan las plantas cruce y al 1.0% de las plantas psCHIT33. Se hallaba un comportamiento parecido en el porcentaje frente a NaCl (Figura II.18), donde la tasa correspondiente a las plantas cruce se asemejaba mucho a la de las psCHIT33.

Las plantas psCHIT33 presentan la mayor tasa de supervivencia con respecto al control, mostrando un 53.3% frente a un 8.3 %, respectivamente.

El cobre genera un efecto drástico sobre el tabaco, provocando directamente la muerte de la germinula control. Las plantas portadoras de las quitinasas presentan mayor supervivencia y menor mortandad que las control, por lo que parece existir mayor tolerancia frente a este metal.

La Figura II.21 muestra el efecto del cobre y el cadmio sobre las plántulas portadoras de las quitinasas de *Trichoderma*. El daño producido por el cadmio es más evidente que el del cobre, debido a que la clorosis que sufre el tejido vegetal es más clara en el primero de los casos.



Respecto al cobre (Figura II.20B), las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las plantas control y el resto de líneas pueden establecerse entre los porcentajes de morbilidad, los de supervivencia...

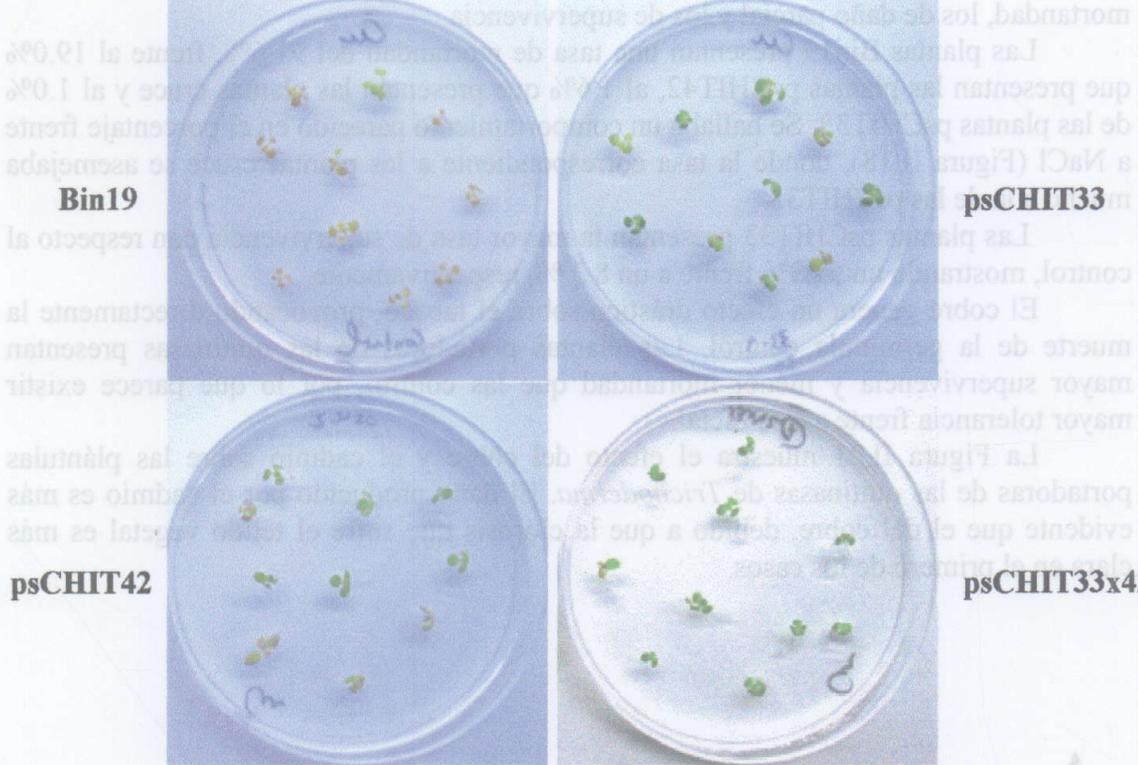


Figura II.21. Efecto de los metales pesados sobre las distintas líneas transgénicas. A, daño efectuado por el cadmio y B, por el cobre; ambos a una concentración de 300µM. La evaluación de los daños se realizó a los 7 días. El ensayo se realiza como se indica en el apartado 20.3.2 de Materiales y Métodos. Se analizaron 60 germínulas de cada una de las líneas transgénicas.

Discusión II

La manipulación genética de plantas ha sido, desde hace tiempo, una de las estrategias seguidas en los programas de mejora de control biológico. La obtención de plantas más resistentes al daño generado por los agentes bióticos y abióticos, se ha conseguido mediante la sobreexpresión en plantas de proteínas, procedentes de determinados organismos, que están implicadas en la defensa frente a éstos. Considerando la hipótesis gen a gen, se han producido en plantas proteínas que provocan una interacción incompatible, activando consecuentemente los mecanismos de respuesta (Bolar *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2003; Apartado 4 de *Introducción II*).

La expresión de enzimas que afectan la viabilidad de los fitopatógenos ha sido una de las estrategias empleadas con más frecuencia. Entre ellas, cabe destacar las enzimas hidrolíticas, quitinasas y glucanasas, de origen vegetal, fúngico o bacteriano; y proteínas vegetales, como las PR, implicadas en el mecanismo de respuesta al ataque de patógenos (Alexander *et al.*, 1993; Jach *et al.*, 1995; Laugé & De Wit, 1998; Lorito *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1994). Otra estrategia seguida ha sido la expresión de proteínas que afectan los niveles de las formas activas de oxígeno como peroxidasas, catalasas y enzimas de la síntesis del ácido salicílico, entre otras (Amaya *et al.*, 1999; Chamnongpol *et al.*, 1998; Roxas *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2000; Veena *et al.*, 1999).

En nuestro laboratorio se obtuvieron plantas de tabaco más resistentes a hongos fitopatógenos mediante la expresión de la quitinasa CHIT42 del hongo micoparásito *T. harzianum* (García, 1997, Tesis Doctoral). En las plantas transgénicas psCHIT42, la hidrolasa se exporta correctamente al apoplasto, al fusionar a la secuencia de la enzima un péptido señal de origen vegetal. Las diferentes líneas transgénicas, mostraban mayores tasas de supervivencia frente al fitopatógeno *R. solani*; aunque también de forma preliminar presentaban mayor resistencia frente a *A. alternata* (García, 1997, Tesis Doctoral). Se propuso, entonces, que la quitinasa heteróloga podría contribuir a la liberación de moléculas elicitoras en las etapas iniciales de la infección por *Rhizoctonia*, actuando del mismo modo que las quitinasas vegetales localizadas en el apoplasto (Lorito *et al.*, 1998).

Estos resultados promovieron la obtención de nuevas líneas de tabaco, que expresaran en este caso la quitinasa CHIT33 de *T. harzianum*, que presentaba actividad antifúngica *in vitro* (de la Cruz *et al.*, 1992; Dana *et al.*, 2001; Limón *et al.*, 1999). La enzima CHIT33 presenta homología, a nivel de proteína, con las quitinasas vegetales; a diferencia de la hallada en la CHIT42, que se asemeja más a las de origen bacteriano (Tabla II.4 de *Introducción II*; García *et al.*, 1994; Limón *et al.*, 1995). Las enzimas vegetales homólogas a la CHIT33 son en su mayoría quitinasas de tipo III, que son extracelulares, carecen de dominio de unión a quitina (DUQ) y están implicadas en defensa. Las quitinasas de tipo III se sintetizan rápidamente tras una interacción incompatible, alrededor del área necrótica característica de la respuesta hipersensible; y están correlacionadas con la respuesta sistémica adquirida (Kasprzewska, 2003).

Las enzimas CHIT42 y CHIT33 muestran sinergismo *in vitro* en la hidrólisis de paredes celulares de origen fúngico (de la Cruz *et al.*, 1992). Por ello, se llevó a cabo la obtención de plantas de tabaco que expresaran ambas enzimas, con el fin de conseguir plantas más resistentes, en el caso de que el efecto observado *in vitro* fuera extrapolable a *in planta*, como se había demostrado previamente para otras enzimas hidrolíticas coexpresadas en tabaco (Zhu *et al.*, 1994).

Teniendo en cuenta trabajos previos que habían demostrado la interconexión existente entre las rutas de respuesta a estrés biótico y abiótico (Droillard *et al.*, 2000; Ellis & Turner, 2001; Hoyos & Zhang, 2000; Kizis *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Zhang & Klessig, 2001; Zhang & Liu, 2001; Zhu, 2001a), se han realizado diferentes

ensayos funcionales para determinar si las plantas transgénicas portadoras de las quitinasas son más resistentes no sólo a patógenos sino también a daños provocados por otros tipos de estreses como la sal o los metales.

Los ensayos de resistencia *in vitro* frente a *R. solani* han confirmado, en el caso de las plantas psCHIT42, los resultados obtenidos en trabajos anteriores y han reforzado los hallados para especies como la fresa, la patata o los manzanos (Bolar *et al.*, 2001; Lorito *et al.*, 1998; Yubero-Serrano *et al.*, 2002).

La resistencia probada de las plantas psCHIT42 se explicó en su momento, considerando la hipótesis de que la quitinasa, localizada en el apoplasto, liberaba elicitores a partir del organismo invasor, activando rápidamente los mecanismos de defensa (Lorito *et al.*, 1998); no obstante, se han hallado en determinadas líneas, niveles elevados de expresión de genes PRs, en ausencia de infección por patógeno. Este hecho concuerda con la presencia de niveles de actividad peroxidasa superiores a los encontrados en las plantas control Bin19, bajo las mismas condiciones (Figura II.15); lo que sugiere que otros mecanismos pueden estar implicados en la potenciación de la defensa en las plantas transgénicas. Este supuesto sería compatible con la hipótesis de los elicitores mencionada anteriormente; esto es, podrían actuar conjuntamente ambos efectos incrementando así la resistencia de la planta.

Considerando la hipótesis gen a gen (Bonas & Lahaye, 2002; Apartado 2.1.1 de *Introducción II*), la quitinasa CHIT42, como molécula fúngica, podría ser reconocida por la planta como producto de un gen de avirulencia, que interaccionaría con el producto de un gen de resistencia perteneciente al hospedador, provocando una interacción incompatible que activara de forma constante la ruta de transducción de señales, la cual forma parte de los mecanismos de defensa de la planta (Apartado 2.1.1 y Tabla II.2 de *Introducción II*). Esto explicaría los niveles basales de determinados marcadores de la respuesta hipersensible encontrados en las líneas transgénicas analizadas. Un resultado similar ha sido descrito en cultivos de células de tabaco incubadas en presencia de una xilanas (TvX) de *T. viride*. En este caso, la hidrolasa no inducía los mecanismos de defensa por su actividad en sí, sino por ser reconocida como molécula de origen fúngico, lo que desencadenaba la respuesta de defensa en las células, entre las que se hallaba la síntesis de proteínas PR, como la quitinasa básica de clase I (Yamamoto *et al.*, 1999). Una respuesta similar se conseguía en hojas de tabaco frente a una quitinasa purificada de *T. viride*, la cual inducía la respuesta de defensa (Bailey *et al.*, 1992).

La quitinasa CHIT42 carece de homología con las quitinasas de origen vegetal, asemejándose por el contrario a las de origen bacteriano, lo que refuerza la hipótesis de que sea reconocida como una molécula extraña por la planta (Tabla II.4 de *Introducción II*). En las líneas psCHIT42 la quitinasa, sintetizada de forma constitutiva, podría constituir el producto de un gen *Avr* de origen fúngico, que activara permanentemente los mecanismos de defensa de la planta, sin necesidad de que existiera infección por un patógeno. Por un lado, la planta estaría en constante alerta y se hallaría mejor preparada ante infecciones potenciales, al mantener activos mecanismos de respuesta, como la actividad peroxidasa y los niveles de expresión de determinados genes PRs (Figura II.15 y Figura II.16 de *Resultados II*). Por otro, la quitinasa además de ser reconocida como molécula de origen fúngico, podría ser funcionalmente activa actuando sobre las paredes celulares del microorganismo patógeno en caso infección, liberando oligómeros inductores de la respuesta de defensa; actuando, de este modo, conjuntamente con la batería enzimática propia de la planta (Figura II.15 y Figura II.16 de *Resultados II*).

Aunque la cinética de activación de la actividad peroxidasa en las plantas psCHIT42 es menor a la hallada en las plantas Bin19, presentan un mejor

comportamiento con respecto a las plantas control, como se puede observar por la tasa de supervivencia frente a *R. solani*, por el desarrollo del área necrótica en la respuesta hipersensible existente, y por la resistencia mostrada frente a estrés abiótico (Tabla II.7, Figura II.17, Figura II.18, Figura II.20 en *Resultados II*). Esto sugiere que poseer niveles basales superiores de aquellas proteínas que intervienen activamente en la respuesta del organismo puede resultar importante para mejorar la defensa, así como también puede reflejar de forma indirecta la posible activación de otros genes implicados en la protección de la planta.

El análisis funcional realizado con las plantas psCHIT33, muestra una respuesta mejorada con respecto a las plantas Bin19, e incluso con respecto a las plantas psCHIT42 y psCHIT33x42. El nivel basal de actividad peroxidasa hallado en las plantas psCHIT33 es superior, y la cinética de activación es más pronunciada que en el resto de las plantas (Figura II.15 de *Resultados II*). Esta respuesta mejorada se halla reflejada asimismo en la expresión génica del gen que codifica la proteína PR-1a, que es un marcador esencial en la defensa de la planta (Figura II.16 de *Resultados II*).

De igual modo que en el caso de la CHIT42, la expresión constitutiva de la CHIT33 podría mantener activos de forma continuada los mecanismos de protección en la planta, lo que contribuiría a una respuesta más eficaz de ésta ante la presencia de un fitopatógeno; y por otro lado, podría participar activamente en la hidrólisis de las paredes celulares del microorganismo invasor, constituyendo un suplemento a la batería enzimática de la planta. El factor adicional hallado en este caso, es la elevada homología que presenta la CHIT33 con las quitinasas vegetales (Tabla II.4 de *Resultados II*), por lo que la planta podría sentir su expresión constitutiva como el incremento de una molécula endógena de respuesta a patógeno. La presencia de cantidades elevadas de CHIT33 en el apoplasto, podría ser interpretada de alguna manera, como una situación de alerta, donde las enzimas hidrolíticas de defensa de la planta se sintetizan y exportan activamente (Busam *et al.*, 1997).

Un efecto adicional a considerar, sería la liberación de oligómeros inductores de la respuesta de defensa de la planta causada por la actividad de esta enzima sobre sustratos vegetales. Aunque aún no ha sido identificado un sustrato endógeno para las quitinasas, existen evidencias de que estas enzimas degradan determinadas proteínas ricas en arabinogalactanos, presentes en las plantas (van Hengel *et al.*, 2001; van Hengel *et al.*, 2002). Asimismo, se han descrito oligosacarinas (OGAs) que contienen NAGa en su molécula, originadas en la hidrólisis de glicoproteínas apoplásticas unidas por enlaces de tipo N, como determinadas peroxidasas (Fry *et al.*, 1993; Kasprzewska, 2003). Numerosos trabajos han demostrado el papel de las oligosacarinas en la inducción de la respuesta hipersensible en plantas (Ebel, 1988; Ridley *et al.*, 2001; Apartado 3 de *Introducción II*).

El efecto sinérgico mostrado *in vitro* por las hidrolasas CHIT33 y CHIT42 (de la Cruz *et al.*, 1992), no se reproduce en las plantas de tabaco que coexpresan ambas enzimas. Una posible explicación de este resultado podría ser la existencia de competencia por sustratos hidrolizables o receptores entre ambas. La expresión constitutiva de ambas enzimas, por otro lado, podría provocar en la planta un estado de estrés basal superior al hallado en cada uno de los parentales, lo que podría explicar el incremento en los niveles de expresión basales de ciertos marcadores de la respuesta hipersensible, como el gen que codifica la proteína PR-1a (Figura II.16). No obstante, la respuesta de estas plantas resulta intermedia en los ensayos de estrés biótico, probablemente por la saturación a la que el sistema se halla sometido al coexpresar ambas hidrolasas, aunque no exista repercusión negativa en el crecimiento vegetativo y en la morfología de la planta.

Las plantas transgénicas portadoras de las quitinasas de *T. harzianum* presentan un mejor comportamiento frente a fitopatógenos de diferente naturaleza. La actividad peroxidasa elevada se traduciría en un mayor reforzamiento de la pared celular, lo que contribuiría a incrementar la barrera física de entrada de fitopatógenos y de propagación de éstos a través de los tejidos vegetales (Hückelhoven & Kogel, 2003; McLusky *et al.*, 1999); lo que concuerda con la resistencia hallada frente a *R. solani*, la reducción en la permanencia de *P. syringae* pv *tabaci* y la reducción en el área necrótica desarrollada en la respuesta hipersensible en las diferentes líneas ensayadas (Tabla II.6, Figura II.12, Figura II.14, Figura II.17 de *Resultados II*).

En el mecanismo de defensa en las plantas, se conoce la participación activa del ácido salicílico, que contribuye a incrementar los niveles de formas ROS al inhibir a gran parte de las enzimas que intervienen en su detoxificación; sin afectar, por el contrario, a las peroxidases aniónicas, que intervienen en el reforzamiento de la pared celular (Bi *et al.*, 1995; Durner & Klessig, 1995; Mittler *et al.*, 1999; Mittler, 2002; Takahashi *et al.*, 1997). Asimismo, el salicílico modula la expresión de genes de defensa de la planta, como los correspondientes a las proteínas PRs (Klessig *et al.*, 2000). Se han identificado y caracterizado elementos de respuesta al SA en la región promotora del gen PR-1a (Strompen *et al.*, 1998). Los niveles de expresión detectados en las plantas que portan las quitinasas, se asemejan a los hallados en aquellas tratadas exógenamente con salicílico (Figura II.16), lo que sugiere indirectamente la participación de esta molécula mensajera en las plantas transgénicas.

Con respecto a los ensayos de estrés abiótico realizados, las plantas psCHIT42, psCHIT33 y psCHIT33x42 muestran una respuesta mejorada con respecto a las plantas control. Los resultados obtenidos constatan los numerosos estudios que prueban la interconexión existente entre las rutas de respuesta a daño biótico y abiótico, e incluso entre las de respuesta a distintos tipos de fitopatógeno, que fueron consideradas como antagónicas en determinados casos (Ellis & Turner, 2001; Maleck & Dietrich, 1999; Schenk *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002).

Uno de los efectos comunes provocados por ambos tipos de estrés es el desequilibrio redox de la célula, debido a la formación de especies activas de oxígeno. La mayor tasa de detoxificación, llevada a cabo en las plantas transgénicas, puede explicarse por la existencia de un nivel de actividad peroxidasa más elevado, entre otros factores. La actividad medida en el presente trabajo, estaría ligada a la utilización de estas formas ROS en la construcción de los polímeros de la pared celular vegetal (Fath *et al.*, 2002).

Con respecto al estrés osmótico producido por la presencia de NaCl en el medio, la existencia de niveles elevados de actividad peroxidasa podría ser beneficiosa para lograr una mayor resistencia. El engrosamiento de la pared podría favorecer la retención de moléculas de agua por parte de ésta. Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión en plantas de tabaco de la peroxidasa TPX2 de tomate, incrementaba la tasa de germinación de las semillas, al favorecer el aumento del contenido hídrico de la pared celular (Amaya *et al.*, 1999).

Como marcadores moleculares de la respuesta al estrés salino, se pueden considerar los genes *tas14* y *tsw12*, que constituyen una dehidrina y un péptido antimicrobiano, respectivamente, que se inducen en tomate ante este tipo de estrés (Godoy *et al.*, 1994; Torres-Schumann *et al.*, 1992). Análisis preliminares realizados en nuestro laboratorio, han mostrado una activación basal del gen *tsw12*, en el caso de las plantas psCHIT33 y psCHIT33x42, al detectarse la proteína en extractos provenientes de plantas sin infectar (datos no mostrados); lo que sugiere que los mecanismos de defensa frente a estrés abiótico se hallan activos en estas plantas. Los resultados

negativos respecto a la proteína TAS14 pueden deberse a la falta de homología con las proteínas del tabaco y a la ausencia de reconocimiento por parte del anticuerpo.

El daño tóxico generado por los metales pesados es paliado en mayor medida por las plantas psCHIT42, psCHIT33 y psCHIT33x42, ya que muestran mayor supervivencia frente a concentraciones que resultan tóxicas para las líneas control (Figura II.20, Figura II.21 de *Resultados II*). La mayor mortandad en presencia de cadmio puede deberse al daño que genera este metal ya que, además de provocar estrés oxidativo, puede desplazar grupos funcionales de biomoléculas esenciales, anulando su función; y, por otro lado promover la lignificación del tejido radicular, lo que dificulta la toma de nutrientes, resultando en la muerte de la germínula (Schützendübel & Polle, 2002).

En resumen, podríamos afirmar que la expresión constitutiva de las quitinasas CHIT42 y CHIT33 de *T. harzianum* en plantas de tabaco, mantienen activos los mecanismos de defensa de la planta sin necesidad de que exista infección; por lo que se cuenta con un estado basal de mayor protección. Por otro lado, la expresión de las quitinasas mejora la respuesta ante el daño provocado tanto por estrés biótico como abiótico, lo que sugiere que estas enzimas hidrolíticas intervienen en la activación de las rutas de respuesta a estos daños, que se hallan interconectadas (Singh *et al.*, 2002); aunque no se descarte que también puedan actuar en la defensa gracias a su actividad enzimática, dañando la pared celular del patógeno y/o interviniendo en la liberación de elicitores.

Capítulo III

Clonación y regulación del gen *gla66* de *Trichoderma harzianum*

Introducción III

1. LOS HONGOS AMIOLÍTICOS

Numerosos hongos filamentosos y levaduras poseen las denominadas enzimas amilolíticas, las cuales permiten utilizar el almidón y sus derivados como fuente de carbono. Entre estos hongos se encuentran especies de reconocido interés industrial pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Trichoderma* y *Saccharomyces*. Las enzimas amilolíticas, como las α -amilasas, se hallan en un amplio rango de organismos, mientras que las glucoamilasas son casi exclusivamente de origen fúngico (Radford *et al.*, 1996).

2. ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN

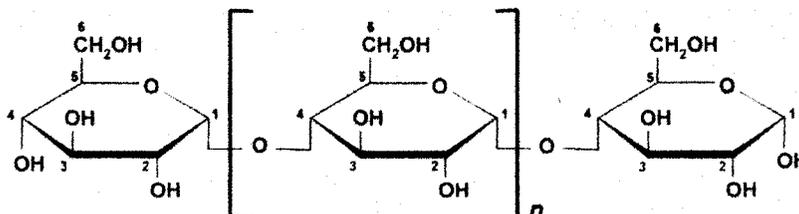
El almidón es junto a la celulosa, el polímero más abundante en las plantas. Su principal función es la de reserva y se deposita en forma de gránulos pequeños (1-100 μm) en orgánulos como los cloroplastos y los amiloplastos. Estos pequeños gránulos blancos, insolubles en agua fría, se pueden localizar en diversas partes de la planta como, por ejemplo, en las semillas (cereales), en las raíces (tapioca) y en los tubérculos (patata).

El almidón está compuesto por unidades de glucosa unidas por enlace α -1,4 glucosídico, con enlaces adicionales α -1,6 y está constituido por dos tipos de polímero: **amilosa** y **amilopectina** (Figura III.1). La proporción de ambos varía, aunque normalmente la fracción correspondiente a la amilosa supone un 20-30 % del total.

La **amilosa** es el componente soluble del almidón y es un polímero prácticamente lineal, ya que la frecuencia de enlaces α -1,6 (0.2-0.7%), es menor que en el caso de la amilopectina (4-5%). Constituye la región amorfa del gránulo de almidón y su grado de polimerización se halla en torno a 1000 unidades de glucosa.

La **amilopectina**, por el contrario, es un polímero ramificado e insoluble. Está constituido por cadenas lineales de 20 a 24 residuos de glucosa unidos por enlace α -1,4 conectadas, a su vez, por enlaces α -1,6 glucosídico. Su grado de polimerización se halla en torno a 10000-100000 unidades de glucosa.

A



B

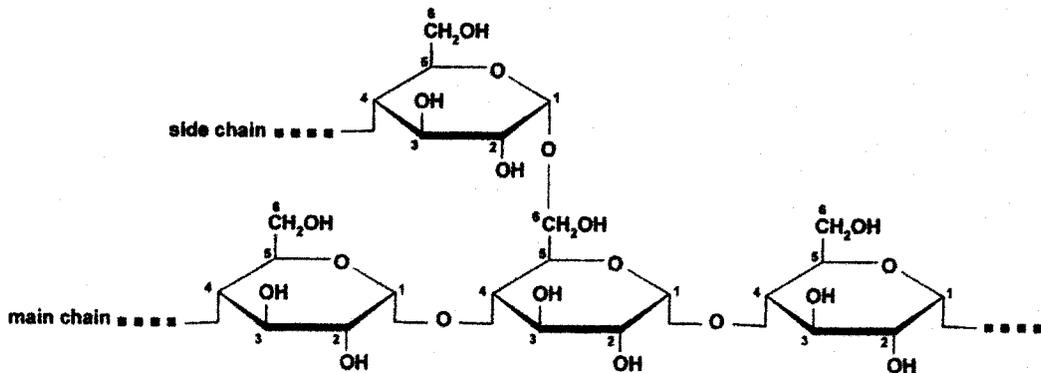


Figura III.1. Estructura del almidón. Polímeros de amilosa (A) y amilopectina (B).

3. EL COMPLEJO AMIOLÍTICO. POSIBLES APLICACIONES

Las enzimas que intervienen en la degradación del almidón, actúan sobre sustratos como la amilosa, la amilopectina y el glucógeno. Otro de los α -glucanos ampliamente distribuido en la naturaleza es el **glucógeno**, que constituye la principal reserva energética de las células animales y de hongos, excepto en el caso de los oomicetos, que poseen β -1,3 glucanos (Benítez *et al.*, 1998). El glucógeno es similar a la amilopectina, aunque presenta mayor grado de ramificación (cada 8 o 10 residuos de glucosa).

La mayoría de las enzimas amilolíticas pertenecen principalmente a tres familias glicosil hidrolasas: la **familia 13**, que engloba a las α -amilasas y ciclodextrin glucanotransferasas (CGTasas), entre otras enzimas; la **familia 14**, que agrupa a las β -amilasas; y la **familia 15**, que agrupa a las glucoamilasas. Las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.-) engloban a todas aquellas enzimas capaces de hidrolizar enlaces glucosídicos entre dos carbohidratos, o entre un carbohidrato y otra molécula.

Atendiendo a la forma de actuación, se establecen dos grupos dentro de las enzimas amilolíticas: **exoamilasas** y **endoamilasas** (Figura III.2).

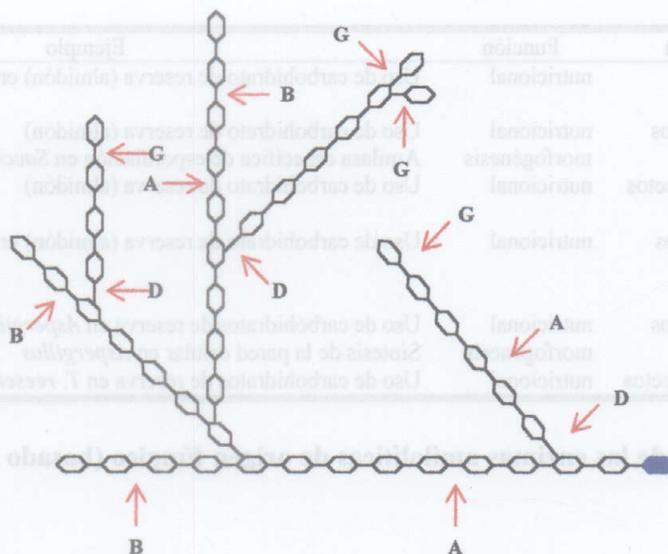


Figura III.2. Mecanismo de acción de las principales enzimas amilolíticas. Se esquematiza una molécula del tipo amilopectina. Las flechas indican los sitios potenciales de hidrólisis para las α-amilasas (A), β-amilasas (B), isoamilasas (D) y glucoamilasas (G). El extremo reductor de la molécula está marcado en azul.

Las **exoamilasas** rompen los enlaces α-1,4 glucosídicos a partir del extremo no reductor del sustrato. Dependiendo de la enzima, puede o no hidrolizar los enlaces glucosídicos α-1,6 que se hallan en los puntos de ramificación del polímero. Se han descrito hasta el momento tres tipos de exoamilasas: α-exoamilasas, glucoamilasas y β-exoamilasas. Las α-exoamilasas hidrolizan los enlaces glucosídicos α-1,4 generando maltosa u oligosacáridos de mayor longitud. Las **glucoamilasas** hidrolizan principalmente enlaces α-1,4; aunque también pueden catalizar la hidrólisis, en menor medida, de enlaces glucosídicos α-1,6 y α-1,3. Provocan por tanto la degradación completa del almidón o del glucógeno a D-glucosa.

Las **endoamilasas** se clasifican en α-amilasas, isoamilasas, oligo-1,4-glucosidasas, oligo-1,6-glucosidasas, o CGTasas; dependiendo del método original utilizado en la clasificación de las enzimas. Dentro de este grupo cabe destacar el papel de las CGTasas que, como las α-amilasas, hidrolizan los enlaces α-1,4 internos, y generan una amplia variedad de ciclodextrinas como productos. Las α-, β- o γ-ciclodextrinas, son anillos formados por seis, siete u ocho residuos de glucosa, respectivamente, unidos por enlace α-1,4.

Desde un punto de vista evolutivo, las α-amilasas y las CGTasas proceden de un ancestro común. Comparten motivos en la secuencia y conservan residuos imprescindibles para la actividad de la enzima (del Río *et al.*, 1997). Las amilasas, las α-glucosidasas y las CGTasas muestran características estructurales comunes en el sitio activo de la enzima (Svensson, 1988).

Numerosos estudios describen la función de las amilasas y glucoamilasas fúngicas (Benítez *et al.*, 1998). En la Tabla III.1 se representa un resumen sobre éstas:

Glucanasa	Origen	Función	Ejemplo
α -1,4-glucanasa (α -amilasa)	Oomicetos	nutricional	Uso de carbohidrato de reserva (almidón) en <i>Mucor</i>
	Ascomicetos	nutricional morfogénesis	Uso de carbohidrato de reserva (almidón) Amilasa específica de esporulación en <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
	Basidiomicetos	nutricional	Uso de carbohidrato de reserva (almidón)
glucoamilasa (exo α -1,4; α -1,3; α -1,6)	Zigomicetos	nutricional	Uso de carbohidrato de reserva (almidón) en <i>Rhizopus</i>
	Ascomicetos	nutricional morfogénesis	Uso de carbohidratos de reserva en <i>Aspergillus</i> spp. y en <i>S. cerevisiae</i> Síntesis de la pared celular en <i>Aspergillus</i>
	Deuteromicetos	nutricional	Uso de carbohidratos de reserva en <i>T. reesei</i>

Tabla III.1 Función de las enzimas amilolíticas de origen fúngico (basado en Benítez et al., 1998)

En cuanto a la aplicación de estas enzimas, el papel de las amilasas en conjunto con otras enzimas, como las glucoamilasas, se ha centrado fundamentalmente en la industria de la alimentación, concretamente en la obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón. Actualmente se utilizan asimismo en la producción de detergentes. Por el contrario su aplicación ha sido escasa en la industria textil, de la cerveza o en el tratamiento de aguas residuales. Cabe destacar el enorme interés industrial de las ciclodextrinas generadas por acción de algunas enzimas amilolíticas. Poseen regiones internas hidrofóbicas, que las convierten en vehículos potenciales para encapsular y proteger compuestos utilizados en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Las ciclodextrinas pueden asimismo solubilizar y/o estabilizar una variedad de compuestos inorgánicos.

4. GLUCOAMILASAS: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y LOCALIZACIÓN

4.1. ESTRUCTURA DE LAS GLUCOAMILASAS. ISOENZIMAS

Las glucoamilasas [exo-1,4- α -D-glucan glucohidrolasas, (EC 3.2.1.3)], que se hallan casi exclusivamente en hongos, son exo-hidrolasas que catalizan la liberación de β -D-glucosa a partir del extremo no reductor de la amilosa, la amilopectina, o de los polisacáridos u oligosacáridos relacionados. Generan, por tanto, una hidrólisis secuencial de enlaces glucosídicos α -1,4. Asimismo, estas enzimas pueden romper, aunque en menor proporción, enlaces α -1,6 y α -1,3 (Radford et al., 1996). Las glucoamilasas constituyen la Familia 15 de las glicosil hidrolasas.

La mayoría de las especies que producen glucoamilasas, cuentan asimismo con α -amilasas que actúan de forma sinérgica en la hidrólisis del almidón. Las α -amilasas actúan en las etapas iniciales de la degradación, generando extremos no reductores a partir de las moléculas que constituyen el almidón, que sirven de sustrato a las glucoamilasas (Fujii & Kawamura, 1985).

Las propiedades físicas de estas enzimas fueron descritas por Fogarty (1983). El pH y la temperatura óptimos de actuación de las enzimas procedentes de diversos organismos, está en torno a 4.5-5.0 y 40-60 °C, respectivamente.

La secuencia de la mayoría de las glucoamilasas presentan del extremo amino al carboxilo terminal un péptido señal, un dominio catalítico (CD), una región bisagra o

linker y un **dominio de unión al almidón** (Starch Binding Domain, **SBD**); en las especies *R. oryzae* y de *Saccharomyces*, el dominio de unión se encuentra junto al extremo amino terminal. Existen además, especies cuyas glucoamilasas carecen del dominio de unión al sustrato. A continuación se describen las principales características de cada uno de los dominios anteriormente mencionados:

a) **Dominio catalítico (CD)**

Los estudios realizados a partir de la secuencia de diversas glucoamilasas, procedentes de diferentes especies, establecen que el dominio catalítico está constituido por un grupo de α -hélices dispuestas paralelamente en forma $(\alpha/\alpha)_6$, generando una estructura en forma de barril; donde el sitio activo constituye un hueco en forma de bolsillo o embudo (Sauer *et al.*, 2000). El alineamiento múltiple de secuencias sugiere que el CD consta de tres unidades hidrofóbicas plegadas y que, por norma general, se halla en el extremo amino terminal de las glucoamilasas; excepto en el caso de *R. oryzae* y de *Saccharomyces*, donde se sitúa en el carboxilo terminal (Coutinho & Reilly, 1997).

Dentro del dominio catalítico existen regiones muy conservadas, como la secuencia **DLWEEV**, que se encuentra en las glucoamilasas de hongos filamentosos y de levaduras. Gracias a la mutagénesis dirigida, se ha podido determinar que los residuos de glutámico hallados en la región consenso son esenciales para la catálisis (Radford *et al.*, 1996).

Este dominio se halla glicosilado, lo que aporta estabilidad a la enzima pues la protege de la degradación por proteasas. Las unidades hidrofóbicas del CD se hallan O-glicosiladas. Tan sólo se han hallado dos sitios potenciales de N-glicosilación en el conjunto de glucoamilasas analizadas: Asn¹⁷¹ y Asn³⁹⁵ (Coutinho & Reilly, 1997; Radford *et al.*, 1996).

b) **Región bisagra o linker**

Esta región une el dominio catalítico con el de unión al almidón generando un lazo flexible entre ambos, lo que les permite su proximidad en solución. La región "linker" estabiliza la estructura del dominio catalítico y la del SBD. Su secuencia varía según la especie, pero generalmente es una zona rica en prolina, serina y treonina. La O-glicosilación, muy presente en esta región, se da fundamentalmente sobre los residuos de treonina y de serina, a los que se unen manosas (Janeček & Šeučík, 1999).

c) **Dominio de unión al almidón (SBD)**

En su estructura predomina la hoja plegada β . El SBD posee una doble función: por un lado se une al sustrato y, por otro, contribuye a perturbar la estructura del polímero al romper las interacciones intermoleculares de las cadenas de α -glucano en la superficie de éste, contribuyendo así al aumento de la tasa amilolítica (Giardina *et al.*, 2001).

El dominio SBD posee dos lugares de unión que se disponen perpendicularmente entre sí: el denominado *Sitio I*, que interviene en el reconocimiento del sustrato y el *Sitio II*, que gira las cadenas del polímero y las expone al dominio catalítico (Southall *et al.*, 1999). Por tanto, las cadenas amilolíticas sufren un cambio conformacional tras la unión del SBD, formándose lazos que aumentan la concentración local de sustrato en el sitio activo de la enzima (Giardina *et al.*, 2001).

En la mayoría de los casos el SBD se sitúa en la zona carboxilo terminal de la enzima, excepto en el caso de *R. oryzae*, donde se halla en el extremo amino (Coutinho & Reilly, 1997).

Los SBD no sólo están presentes en las glucoamilasas, también existen en las α -amilasas, β -amilasas y CGTasas. Posee residuos muy conservados, algunos de los cuales se consideran claves en la unión al sustrato: en el *Sitio I* se hallan los residuos Trp⁵⁴³ y Trp⁵⁹⁰, presentes en los SBD de origen fúngico y bacteriano (Radford *et al.*, 1996). En cambio, en el extremo carboxilo terminal del dominio hallamos una arginina (Arg⁶¹⁶) en hongos, mientras que en bacterias encontramos una glutamina (Janeček & Šeučík, 1999).

Las glucoamilasas fúngicas son glicoproteínas, constituyendo el carbohidrato entre un 5 y un 20% de la enzima. Existen casos, en los que la fracción de carbohidrato no supera el 1%, como la glucoamilasa de *T. reesei* (Fagerström & Kalkinen, 1995); o bien está en torno al 12-40%, como en el caso de *A. awamori* (Neustroev *et al.*, 1993). Generalmente, se unen a la proteína residuos de glucosa, glucosamina, manosa y galactosa. Suelen existir dos uniones por enlace N-glucosídico y en torno a cuarenta por enlace O-glucosídico.

La microheterogeneidad encontrada en el patrón de O-glicosilación de las glucoamilasas explica, en parte, la diversidad de enzimas presente en la naturaleza. Cuanto menor sea el grado de glicosilación de la proteína, mayor es la sensibilidad que muestran frente a las proteasas y viceversa, por lo que la función del carbohidrato es la de proteger la enzima de la proteólisis y conferirle estabilidad (Radford *et al.*, 1996).

Las glucoamilasas parecen proceder de un gen de origen bacteriano (Figura III.3). Los pasos evolutivos posteriores muestran la tendencia de estas enzimas a ser exportadas extracelularmente, así como un aumento de su estabilidad gracias a un mayor grado de glicosilación y a un distanciamiento entre sus dominios mediante una región linker (Coutinho & Reilly, 1997).

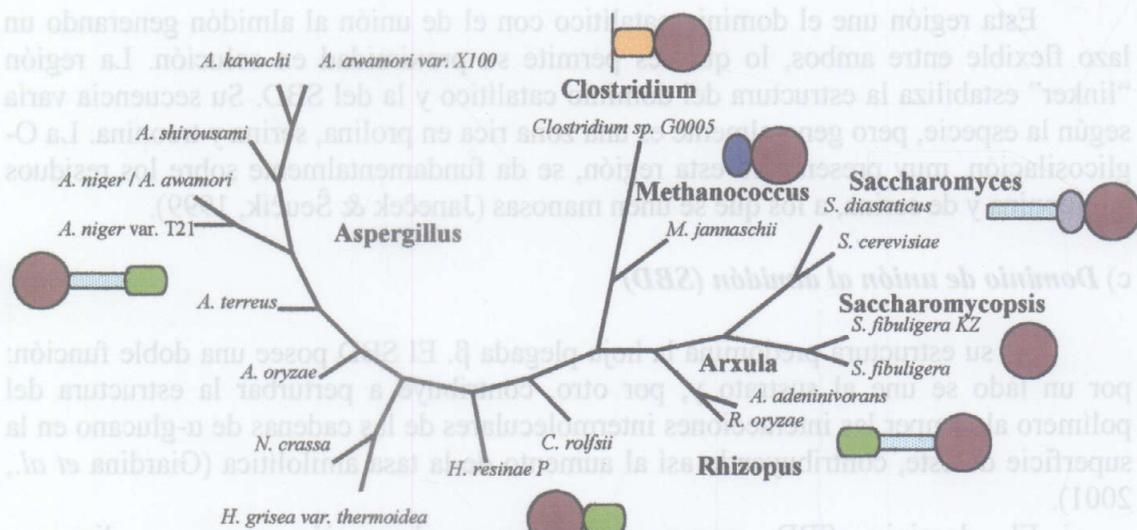


Figura III.3. Evolución de la glucoamilasas. Las especies se muestran en *itálicas* y las subfamilias en **negrita**. Los dominios se denotan como: rojo, dominio catalítico (CD); azul, región bisagra; verde, dominio de unión al almidón (SBD); y resto de colores, otros dominios. La barra vertical indica la unión a la pared celular.

4.1.1. Isoenzimas

Es frecuente que los hongos tengan la capacidad de producir más de una isoenzima en determinadas condiciones de cultivo, que les permita degradar de forma activa el sustrato.

En el caso de *A. niger*, se ha descrito una enzima de 125 kDa capaz de hidrolizar el almidón. Esta enzima se proteoliza en el espacio periplásmico, generando una glucoamilasa de 75 kDa y una enzima del tipo α -amilasa de 53 kDa, que constituyen el extremo amino y carboxilo terminal de la enzima precursora, respectivamente. A su vez, a partir de otra enzima de 71 kDa, se genera por proteólisis otra glucoamilasa de 61 kDa y un péptido no enzimático de 10 kDa (Dubey *et al.*, 2000).

La aparición de nuevas glucoamilasas a partir de una enzima precursora adherida a la pared celular, a lo largo del tiempo de cultivo, también se ha descrito en el caso de *A. awamori* X-100/D27 (Neustroev *et al.*, 1993). La aparición de dos glucoamilasas de 100 kDa y de 85 kDa a partir de un mismo gen que se transcribe desde dos puntos diferentes ha sido descrito en *A. awamori*, en donde además, la eliminación de parte de los carbohidratos unidos a la enzima de mayor tamaño, genera una nueva proteína de 94 kDa (Bhella & Altosaar, 1987).

Otro de los casos estudiados es el de las glucoamilasas de *A. niger*. En un principio, se consideró que las enzimas G1 y G2 se generaban del procesamiento alternativo del intrón situado en el extremo 3' del gen de la glucoamilasa; pero estudios posteriores demostraron que la forma G2 se originaba a partir de la proteólisis limitada de la forma G1 (Boel *et al.*, 1984a; Boel *et al.*, 1984b; Svensson *et al.*, 1986).

4.2. LOCALIZACIÓN DE LAS GLUCOAMILASAS

Por lo general, las enzimas amilolíticas son extracelulares, salvo excepciones encontradas en determinadas levaduras, como la glucoamilasa SGA, específica de esporulación, en *S. cerevisiae* o la de *Saccharomycopsis fibulligera* (Pardo *et al.*, 1987; Radford *et al.*, 1996).

Las proteínas secretadas se sintetizan como preproteínas, las cuales incluyen en su extremo, generalmente amino terminal, un péptido señal que las dirige a la ruta secretora. El procesamiento de este péptido se da por acción de proteasas que actúan sobre una secuencia diana constituida por un doblete de aminoácidos básicos, común en las proteínas secretadas de hongos filamentosos. Las proteasas más conocidas son las Kex1 y Kex2 de *S. cerevisiae*. Recientemente en *T. reesei*, se ha descrito una endopeptidasa dibásica, que actúa de forma similar a la Kex2 (Goller *et al.*, 1998).

Numerosos estudios han analizado la localización y el mecanismo de exportación de las glucoamilasas. En *A. niger*, se ha fusionado traduccionalmente el gen *glaA* al gen marcador *gfp*. En cultivos jóvenes la localización de la proteína quimérica es extracelular, hallándose en menor proporción en los extremos de las hifas y en los septos. A medida que avanza el cultivo, la proteína desaparece del sobrenadante probablemente por la acción de proteasas inducidas o activadas por la acidificación del medio (Gordon *et al.*, 2000a; Gordon *et al.*, 2000b). Trabajos recientes confirman la localización de la glucoamilasa de *A. niger* en la pared celular de los extremos de las hifas y en los septos (Figura III.4), utilizando de nuevo la fusión GLA::GFP (Khalaj *et al.*, 2001).

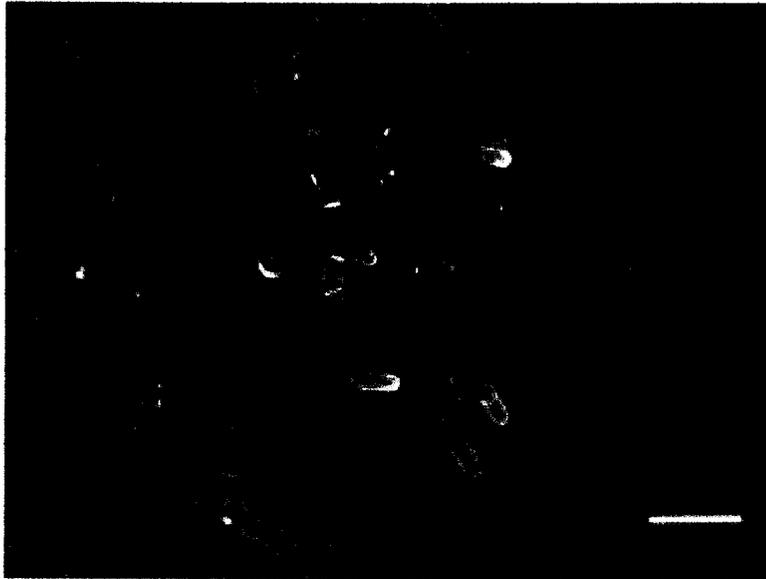


Figura III.4. Localización de la glucoamilasa codificada por el gen *glaA* de *A. niger*. Las imágenes se realizaron mediante microscopía confocal. Se aprecia la localización la proteína de fusión GLA::GFP en los extremos de las hifas y en los septos fundamentalmente. La escala corresponde a 20 μm . (Gordon *et al.*, 2000a).

4.3. FUNCIÓN DE LAS GLUCOAMILASAS

La función del complejo amilolítico es la de degradar el almidón, polímero insoluble localizado fuera del micelio y, por tanto, la de proporcionar productos solubles utilizados como fuente de carbono. Al ser un polímero de gran tamaño, el almidón no se puede transportar al interior del micelio, por lo que las enzimas amilolíticas son exportadas al exterior para proceder a su hidrólisis (Radford *et al.*, 1996).

Se han realizado numerosos estudios que demuestran el papel de estas enzimas en la nutrición del microorganismo (del Río *et al.*, 1997). En *A. awamori*, se ha sugerido que el aumento local de la concentración de la enzima en el extremo de la hifa, contribuye a un aumento del flujo de glucosa hacia el interior de la célula al actuar sobre sustratos amilolíticos. Esto ocurre en cultivos jóvenes, donde la concentración celular es baja. En etapas posteriores, donde el volumen de micelio es mayor, la glucoamilasa se procesa en el espacio periplásmico, probablemente por la acción de una proteasa ácida y se exporta al medio (Neustroev *et al.*, 1993).

Del mismo modo, la glucoamilasa específica de esporulación SGA de *S. cerevisiae* parece intervenir en la degradación de glucógeno, coincidente con la aparición de esporas maduras. La glucoamilasa SGA, aunque es específica de este período, no es esencial para la esporulación (Pardo *et al.*, 1986; Yamashita & Fukui, 1985). En la formación del cuerpo fructífero y de las esporas del basidiomiceto *Lentinula edodes*, se induce la expresión de la glucoamilasa *gla1*, que probablemente interviene en la provisión de nutrientes a partir de la degradación de las reservas celulares de glucógeno (Zhao *et al.*, 2000).

Por tanto, las glucoamilasas participan en procesos metabólicos, morfogenéticos y de desarrollo.

5. EL SISTEMA AMILOLÍTICO DE *Trichoderma*

El estudio de la secreción de proteínas en *Trichoderma*, se ha centrado fundamentalmente en la especie *T. reesei*, de gran interés industrial por su utilización en la producción de proteínas heterólogas, y de enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa (Penttilä, 1998).

La expresión heteróloga de la glucoamilasa P de *Hormoconis resiniae*, condujo a la purificación de la enzima endógena de *T. reesei*. Su peso molecular es de 66 kDa, su pI es 4.0, presenta una actividad óptima a pH 5.5 y presenta tres veces más especificidad por los oligosacáridos derivados de la maltosa que el resto de las glucoamilasas fúngicas. Su extremo amino terminal posee una homología del 60% con las glucoamilasas P y S de *H. resiniae* y con las de *A. niger*. La proporción de carbohidrato en la glicoproteína es menor al 1%. En términos generales, la glucoamilasa de *T. reesei* es bastante parecida a la glucoamilasa de 75kDa descrita previamente en *T. viride* (Fagerström, 1994; Fagerström & Kalkkinen, 1995).

Por otro lado, se ha descrito una α -glucosidasa (EC3.2.1.20) en *T. viride* capaz de hidrolizar enlaces glucosídicos α -1,4 y con menor proporción, enlaces α -1,6 y α -1,3. Su peso molecular es 67 kDa, aunque no se conoce la función desempeñada en el microorganismo (Yamasaki *et al.*, 1995). También en *T. viride* se ha purificado y caracterizado una α -glucosidasa extracelular, cuyo peso molecular es 110 kDa (Shanmugam *et al.*, 2001).

A partir del hongo micoparásito *T. harzianum* 1051, se ha purificado y caracterizado una amilasa, cuyo peso molecular es de 68.7 kDa. Hidroliza glucógeno, amilopectina, maltotriosa y maltotetraosa, y apenas hidroliza la maltosa (de Azevedo *et al.*, 2000).

Las enzimas amilolíticas también parecen contribuir, aunque de una forma menos relevante, en el antagonismo ejercido por *Trichoderma*. En el caso del hongo *T. harzianum* 1051, la amilasa descrita hidroliza parcialmente, *in vitro*, la pared celular del fitopatógeno *Ciniprellis perniciosus*. No obstante, se considera más probable que esta enzima intervenga en la supervivencia del microorganismo en el medio, más que en las primeras etapas del antagonismo (de Azevedo *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha descrito una α -glucosidasa en *T. viride*, que actúa específicamente sobre la toxina RS producida por el fitopatógeno *R. solani* Kühn; por lo que se considera con propiedades antifúngicas, aunque la glucosidasa no afecte ni al crecimiento ni a la germinación del patógeno. Cabe destacar que la toxina en cuestión es una glicoproteína que contiene un 85% de unidades α -D-glucosa (Shaumugam *et al.*, 2001).

Por otro lado y como se describió en *S. cerevisiae* y en *L. edodes*, las glucoamilasas parecen intervenir en el proceso de esporulación. En el caso de *Trichoderma*, se ha observado un descenso relativo en la cantidad de glucógeno como respuesta secundaria a la formación de esporas. Parece existir un uso preferencial de las reservas endógenas cuando el micelio entra en esta fase (Betina & Farkaš, 1998).

6. REGULACIÓN DEL COMPLEJO AMILOLÍTICO DE HONGOS

En términos generales, se puede afirmar que las enzimas amilolíticas están sometidas a represión por fuente de carbono y a inducción por sustrato.

La expresión de las α -amilasas se induce en presencia de maltosa, almidón e isomaltosa y se reprime por glucosa y glicerol (Radford *et al.*, 1996). Recientemente se ha considerado al glicerol como una fuente de carbono no represora para los genes

amilolíticos, efecto que ya había sido descrito previamente con algunos genes de *Trichoderma* (Henrique-Silva *et al.*, 1996; Ilmén *et al.*, 1997; Gomi *et al.*, 2000).

En cuanto a la glucosa, en algunos casos no parece constituir una fuente represora, como para el gen *glaA* de *A. niger*, aunque si lo es para numerosas glucoamilasas y genes analizados de ascomicetos y de basidiomicetos, como el caso de *L. edodes* (Gordon *et al.*, 2000a; Zhao *et al.*, 2000). En la glucoamilasa STA2 de *S. cerevisiae* el factor MIG1, homólogo al CreA, es dispensable para la represión de este gen, lo cual sugiere la intervención de factores adicionales, como el HAP2 (Wirsel, 1989). En numerosos genes de *Trichoderma* se han caracterizado lugares putativos de unión del factor Cre1, aunque tampoco se descartan que existan otros mecanismos implicados en la represión mediada por la glucosa, como parece que ocurre con las glucoamilasas de otras especies (Dana *et al.*, 2001; Ilmén *et al.*, 1996a; Ishida *et al.*, 2000; Lorito *et al.*, 1996b).

Numerosos estudios han analizado la regulación de los genes que codifican las glucoamilasas. En el caso de *A. oryzae* el gen *glaB*, cuya expresión aumenta o disminuye según el micelio crezca en medio sólido o líquido, respectivamente, se activa en presencia de almidón, así como por factores físicos, como la disminución del contenido hídrico, el aumento de temperatura y la presencia de barreras físicas que impidan la propagación de las hifas (Ishida *et al.*, 2000). El análisis del promotor de *glaB* muestra secuencias putativas STRE y HSE, cuyas características se detallaron en el apartado 2.2.3 de la *Introducción I*. Por otro lado, existe una región similar a la *región IIIa*, descrita previamente en otros genes amilolíticos de *A. oryzae* (*amyB*, *glaA* y *agdA*), que interviene en la regulación mediada por maltosa (Gomi *et al.*, 2000). Esta región de *glaB* presenta un motivo de 12 pares de bases denominado caja GC, donde se reconocen las secuencias 5'-GGCGG-3', similar al motivo CDE, descrito previamente en genes que regulan el ciclo celular. Además presenta el motivo 5'-CGGGC-3', localizado también en la región en la *región IIIa*, y que parece intervenir en la inducción por maltosa (Minetoki *et al.*, 1996). Sin embargo, no se han encontrados sitios putativos de unión al factor CreA, implicado en la represión por glucosa.

La regulación del gen *glaA* de *A. niger* se ha estudiado tras fusionar la región promotora de este gen al gen marcador *gfp*. La maltosa, la maltodextrina y el almidón inducen la expresión de la glucoamilasa, mientras que la xilosa la reprime (Gordon *et al.*, 2000b; Santerre-Henriksen *et al.*, 1999). En presencia de maltosa, la inducción del gen se detecta rápidamente, tras 2 horas de añadir esta fuente de carbono al medio (Siedenberg *et al.*, 1999).

El análisis de la expresión de los genes amilolíticos se ha esclarecido enormemente al clonar el gen *amyR* de *A. oryzae*, que codifica un putativo activador transcripcional (AmyR), que posiblemente intervenga en la inducción mediada por maltosa y almidón. Este factor de transcripción tiene características de proteína de unión a DNA, pues su secuencia muestra un motivo de dedos de Zn similar al hallado en la familia de factores *GAL4* ($Zn(II)_2Cys_6$). Su expresión génica es constitutiva, aunque en presencia de glucosa o glicerol, la proteína no se sintetiza, probablemente por un mecanismo de regulación posttranscripcional en el que intervienen tres pautas abiertas de lectura (uORF) que se hallan en la región 5' no codificante de su RNA mensajero. AmyR se une a las secuencias 5'-CGGN₉CGG-3', 5'-CGCN₉CGC-3' y 5'-CGGN₉CGC-3', donde N₉ es una zona rica en AT. Estas secuencias se han descrito en la *región IIIa* de los genes *amyB*, *glaA* y *agdA* (Gomi *et al.*, 2000).

7. REGULACIÓN POSTTRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR uORFs

7.1. INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN EUKARIOTAS

El inicio de la traducción en eucariotas se explica mediante la hipótesis del "scanning", donde el complejo de preiniciación de la traducción 43S se une a la estructura cap 5' o caperuza de guanina del RNA mensajero (mRNA), y va migrando progresivamente en dirección 5'→3' hasta encontrar el codón de inicio de la traducción a partir del cual se comienza a sintetizar la proteína (Kozak, 1989a; revisado en Kozak, 1999).

Que el codon AUG sea el adecuado para el inicio de la traducción, depende de varios factores como la posición que ocupa, esto es, si es el primer AUG hallado en el mRNA; la secuencia que lo rodea o contexto; la presencia de estructuras secundarias aguas arriba o abajo de este codón; y la longitud de la secuencia líder del mensajero (Kozak, 1991a, 1991b, 1991c). Por tanto, los elementos hallados en la secuencia 5' no codificante (5'-UnTranslated Region, 5'-UTR), controlan el acceso potencial de los ribosomas a la pauta de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF) del gen. La región 5'-UTR juega, por tanto, un papel importante en la regulación posttranscripcional de la expresión génica, controlando la tasa de síntesis de proteína a partir de un mRNA concreto.

7.2. REGULACIÓN MEDIADA POR uORFs Y uAUGs

7.2.1. Modo de acción de las uORFs y uAUGs.

Las pequeñas pautas abiertas de lectura (upstream Open Reading Frames, uORFs), o los codones AUG (upstream AUG, uAUGs) en la secuencia líder de un mensajero, están presentes en aproximadamente el 10% de los genes eucarióticos (Kozak, 1999). La disposición de estas secuencias en la región líder puede ser variable (Figura III.5) [Geballe, 1996].

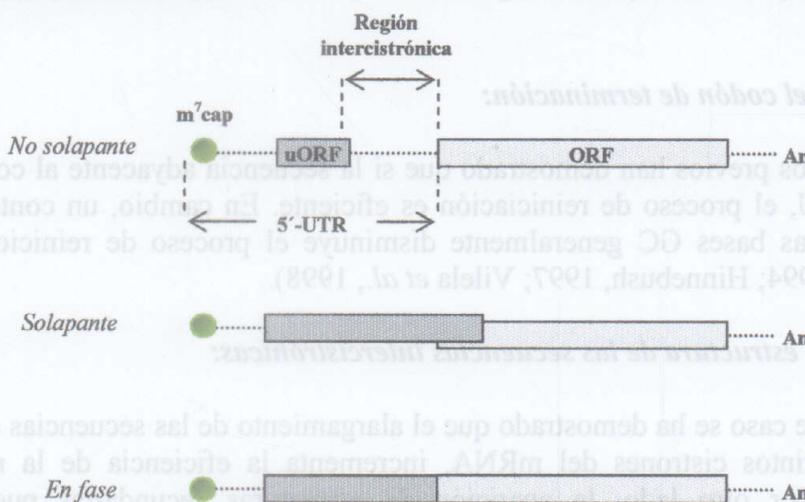


Figura III.5. Disposición de las uORFs en un transcrito eucariótico. Las uORFs situadas en la región 5' no codificante de un mRNA pueden situarse de forma independiente a la ORF principal (*no solapantes*); coincidir con ésta pero llevar una fase de lectura diferente (*solapante*); o bien puede coincidir y estar a su vez en fase con la ORF principal (*en fase*).

Estos uAUGs o uORFs, inhiben normalmente la traducción de la ORF que se sitúa aguas abajo en el RNA mensajero, aunque en algunos casos se ha descrito que pueden estimular la traducción de la ORF principal (Morris & Geballe, 2000; Kozak, 1991c; McCarthy, 1998; Vilela & McCarthy, 2003). El efecto regulador que ejercen estas secuencias ocurre mediante diversos mecanismos (Figura III.6).

7.2.2. Variables que afectan a la función de la uORF

A continuación se enumeran los factores que pueden influir en la función de una uORF en el mecanismo de control posttranscripcional:

a) *Proximidad del AUG a la estructura 5'cap o caperuza de guanina y secuencia contexto:*

El reconocimiento del AUG por el ribosoma y, por consiguiente, el inicio de la traducción, se dificulta o perjudica cuando la longitud de la 5'-UTR es mayor de 15-20 nucleótidos. El contexto en el que se halle el codón de iniciación también influye. Considerando las secuencias consenso descritas en eucariotas, se concluye que la existencia de una adenina en la posición -3 con respecto al AUG, es clave para el inicio de la traducción (Kozak, 1987c, 1989a; revisado en Kozak, 1999).

b) *Longitud de la uORF:*

El número de tripletes de una uORF puede determinar la capacidad del ribosoma de comenzar de nuevo en un codón AUG situado aguas abajo. Trabajos recientes demuestran que el proceso de reiniciación no se lleva a cabo cuando la uORF contiene más de 35 codones (Vilela & McCarthy, 2003). La reiniciación sólo es efectiva en presencia de uORFs pequeñas, probablemente por la tasa de disociación de los factores del complejo que constituye la maquinaria de traducción (Hinnebush, 1997; Kozak, 2001b).

c) *Contexto del codón de terminación:*

Estudios previos han demostrado que si la secuencia adyacente al codón "stop" es rica en AU, el proceso de reiniciación es eficiente. En cambio, un contexto donde predominan las bases GC generalmente disminuye el proceso de reinicio (Grant & Hinnebush, 1994; Hinnebush, 1997; Vilela *et al.*, 1998).

d) *Longitud y estructura de las secuencias intercistrónicas:*

En este caso se ha demostrado que el alargamiento de las secuencias que existen entre los distintos cistrones del mRNA, incrementa la eficiencia de la reiniciación ribosómica. Por otro lado, la aparición de estructuras secundarias puede afectar negativamente a la traducción de las ORFs adyacentes (Kozak, 1987b, 1989b; Vilela *et al.*, 1999).

e) **Secuencia de la uORF y péptido codificado:**

La existencia en la secuencia de tripletes poco frecuentes en el organismo, dificulta la traducción de la uORF y, por tanto, retiene la maquinaria de traducción, entorpeciendo el proceso de reiniciación. En determinados casos, el péptido codificado por la uORF afecta al avance del ribosoma a través de la uORF (Jousse *et al.*, 2001; Vilela & McCarthy, 2003).

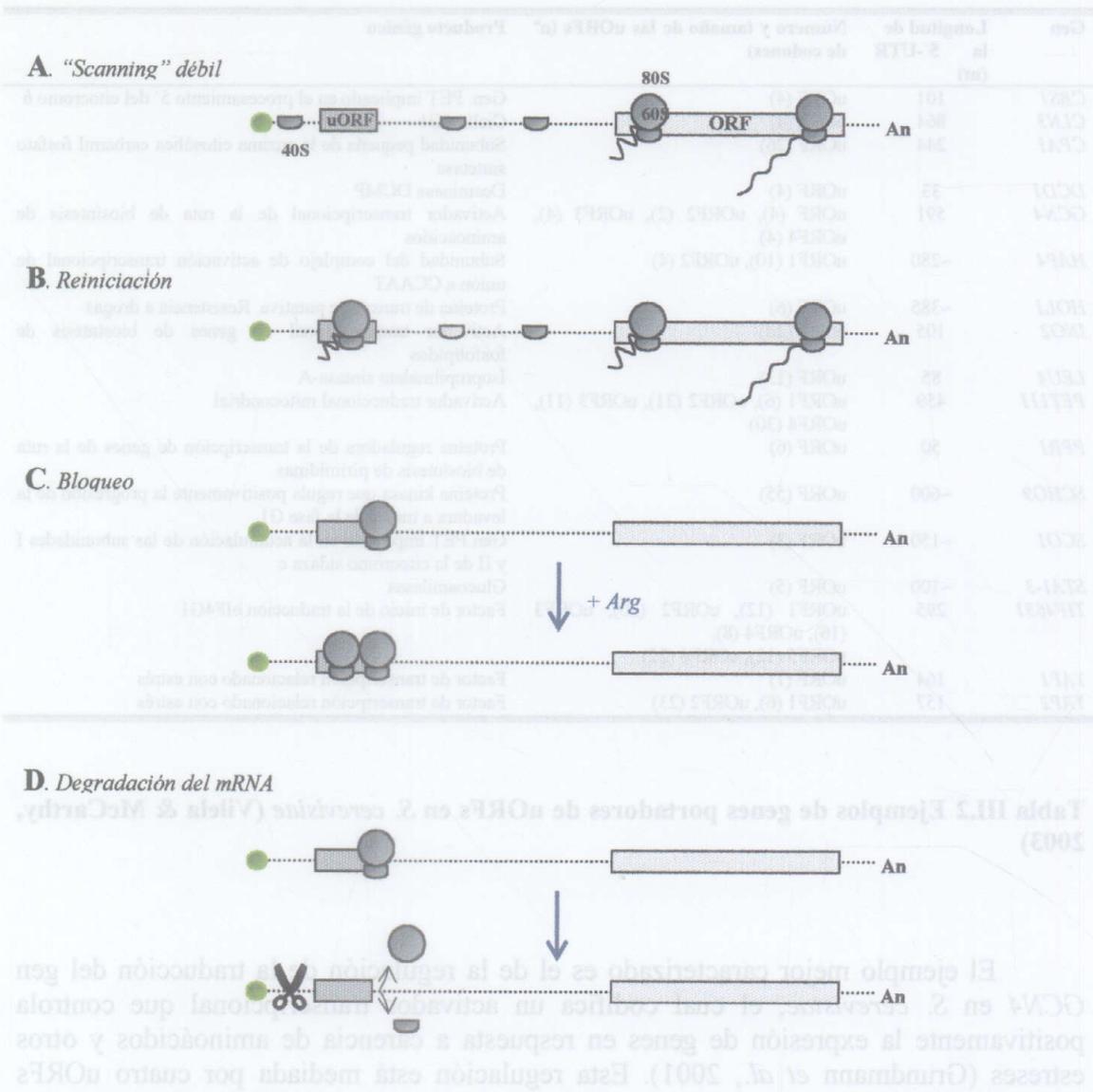


Figura III.6. Mecanismos de acción de las uORFs. Las uORFs pueden no afectar a la traducción de las pautas de lectura situadas aguas abajo. Este es el caso del "scanning débil" (A), donde los ribosomas pasan por alto el codón uAUG y comienzan la traducción a partir de la zona codificante del mensajero; y del proceso de "reiniciación" (B), donde la maquinaria de traducción se ensambla de nuevo para traducir pautas de lectura situadas aguas abajo. Por otro lado, las uORFs también pueden afectar negativamente a la traducción de un RNA mensajero al existir un exceso de sustrato como arginina (Arg), provocando una parada masiva de ribosomas y, por tanto, un bloqueo de la maquinaria traduccional (C). La presencia de uORFs puede conducir a la degradación del transcrito, por lo que puede condicionar la estabilidad del mensajero (D).

7.2.3. Casos descritos en hongos

Aunque las uORFs han sido estudiadas en el control posttranscripcional de numerosos genes de hongos filamentosos, la mayoría de los casos descritos proceden de *S. cerevisiae* (revisado en Sachs, 1998; revisado en Vilela & McCarthy, 2003). En la Tabla III.2, se recogen los conocidos hasta el momento.

Gen	Longitud de la 5'-UTR (nt)	Número y tamaño de las uORFs (n° de codones)	Producto génico
<i>CBS1</i>	101	uORF (4)	Gen PET implicado en el procesamiento 5' del citocromo <i>b</i>
<i>CLN3</i>	864	uORF (4)	Ciclina G1
<i>CPA1</i>	244	uORF (26)	Subunidad pequeña de la enzima citosólica carbamil fosfato sintetasa
<i>DCD1</i>	33	uORF (4)	Deaminasa DCMP
<i>GCN4</i>	591	uORF (4), uORF2 (2), uORF3 (4), uORF4 (4)	Activador transcripcional de la ruta de biosíntesis de aminoácidos
<i>HAP4</i>	~280	uORF1 (10), uORF2 (4)	Subunidad del complejo de activación transcripcional de unión a CCAAT
<i>HOL1</i>	~385	uORF (6)	Proteína de transporte putativa. Resistencia a drogas
<i>INO2</i>	105	uORF (20)	Activador transcripcional de genes de biosíntesis de fosfolípidos
<i>LEU4</i>	85	uORF (13)	Isopropilmalato sintasa-A
<i>PET111</i>	459	uORF1 (6), uORF2 (31), uORF3 (11), uORF4 (30)	Activador traduccional mitocondrial
<i>PPR1</i>	50	uORF (6)	Proteína reguladora de la transcripción de genes de la ruta de biosíntesis de pirimidinas
<i>SCHO9</i>	~600	uORF (55)	Proteína quinasa que regula positivamente la progresión de la levadura a través de la fase G1
<i>SCO1</i>	~150	uORF (3)	Gen PET implicado en la acumulación de las subunidades I y II de la citocromo sidaza c
<i>STAI-3</i>	~100	uORF (5)	Glucoamilasas
<i>TIF4631</i>	295	uORF1 (12), uORF2 (20), uORF3 (16), uORF4 (8), uORF5 (12), uORF6 (22)	Factor de inicio de la traducción eIF4G1
<i>YAP1</i>	164	uORF (7)	Factor de transcripción relacionado con estrés
<i>YAP2</i>	157	uORF1 (6), uORF2 (23)	Factor de transcripción relacionado con estrés

Tabla III.2 Ejemplos de genes portadores de uORFs en *S. cerevisiae* (Vilela & McCarthy, 2003)

El ejemplo mejor caracterizado es el de la regulación de la traducción del gen *GCN4* en *S. cerevisiae*, el cual codifica un activador transcripcional que controla positivamente la expresión de genes en respuesta a carencia de aminoácidos y otros estreses (Grundmann *et al.*, 2001). Esta regulación está mediada por cuatro uORFs situadas en la región líder (591 nucleótidos) del transcrito de este gen (Hinnebush, 1997; Vilela & McCarthy, 2003). El mecanismo de regulación viene determinado por la naturaleza de las interacciones de la maquinaria de traducción con las uORFs, y no por el producto que éstas codifican. La uORF1 promueve la traducción de la pauta de lectura principal, mientras que la uORF4 tiene un efecto inhibitorio; por el contrario, la uORF2 y la uORF3 no ejercen ningún efecto relevante sobre la traducción del mensajero. En condiciones represoras los ribosomas comienzan la traducción a partir de todas las uORFs, ejerciendo la número 4 un efecto de bloqueo sobre la traducción de *GCN4*. En condiciones de desrepresión, los ribosomas traducen la uORF1, obviando la

número 3 y la 4 y, por tanto, pasando por alto la regulación negativa que ejerce esta última.

El gen *cpcA* es el homólogo a *GCN4* en *A. nidulans*. El mRNA transcrito a partir de este gen contiene dos uORFs en la región 5' no codificante (Hoffman *et al.*, 2001). Se ha podido comprobar que la eliminación de estas uORFs potencia la traducción del mensajero, lo que sugiere su implicación en el control posttranscripcional.

Trabajos recientes muestran la regulación del transcrito del gen *CLN3* de *S. cerevisiae*, requerido para el paso de G₁ a S en el ciclo celular. Posee una uORF de cuatro codones cuya eliminación favorece la traducción del mensajero, acelerando la transición de una fase a otra (Gari *et al.*, 2001).

Por otra parte, existen casos donde el péptido codificado por la uORF interviene en la regulación posttranscripcional. Esto ocurre con los genes *CPAI* de *S. cerevisiae* y *arg-2* de *N. crassa*, implicados en la biosíntesis de arginina (Luo & Sachs, 1996). A partir de la uORF, se sintetiza un péptido denominado AAP (Arginine Attenuator Peptide), cuyas características están muy conservadas entre las distintas especies (Fang *et al.*, 2000). El mecanismo mediante el cual este péptido atenuador bloquea al ribosoma no ha sido descrito todavía. En ausencia de este aminoácido, la mayoría de los ribosomas pasan por alto la uORF e inician la traducción a partir de la ORF principal en ambos genes. En presencia de arginina, los ribosomas quedan bloqueados en la uORF, impidiendo la reiniciación en la ORF posterior (Gaba *et al.*, 2001). El homólogo en la especie *T. virens* lo constituye el gen *arg-2* (Shen & Ebbolle, 1997). El transcrito de este gen contiene una uORF, el cual codifica un péptido putativo de 24 residuos. La traducción de esta uORF regula negativamente la de *arg-2*. La secuencia del péptido es idéntica a la hallada en *Magnaporthe grisea* y difiere en tan sólo dos residuos de la de *N. crassa* (Sachs, 1998).

Recientemente, se ha demostrado que la presencia de uORFs no sólo influye en la traducción del RNA mensajero. Este es el caso de las uORFs presentes en los transcritos de los genes *YAP1* y *YAP2* de *S. cerevisiae*, los cuales codifican factores de transcripción relacionados con situaciones de estrés. Tras el análisis exhaustivo de la secuencia líder de los transcritos de ambos genes, se concluye que las uORFs no sólo facilitan o dificultan su traducción, sino también afectan a su estabilidad (Vilela *et al.*, 1998). El efecto desestabilizador hallado en la 5'-UTR del transcrito de *YAP2* es transferible a otros genes. Recientemente se ha sugerido que los mRNAs que contienen uORFs están sujetos a degradación, a menos que contengan un elemento estabilizador (STE) aguas abajo de la uORF, que anule la inestabilidad del transcrito. Al elemento STE se une una proteína denominada Pub1 (de la Cruz *et al.*, 2002; Ruiz-Echevarría & Peltz, 2000; Welch & Jacobson, 1999).

Otro de los casos descritos en levaduras corresponde al de la familia génica polimórfica *STAI-3* de *S. cerevisiae*. Cada uno de los transcritos presenta una uORF en la región 5'-UTR. El mRNA procedente del gen *STA2*, que codifica una glucoamilasa extracelular, contiene además dos codones AUG situados en fase con la ORF principal (Vivier *et al.*, 1999). La maquinaria de traducción pasa por alto la uORF en todos los casos, por lo que no ejercen un efecto negativo en la traducción del mensajero. Por otro lado, la traducción a partir de los distintos uAUGs en *STA2* determina la localización de la enzima, que depende de las condiciones fisiológicas en las que se halle el microorganismo.

Recientemente se ha descrito el caso del gen *INO2* de *S. cerevisiae*, que codifica un activador transcripcional de la ruta de biosíntesis de fosfolípidos. Su región líder contiene una uORF que solapa con la principal y, aunque se sospecha que interviene en la regulación posttranscripcional de este gen, por el momento no hay pruebas que así lo

demuestren (Eiznhamer *et al.*, 2001). Asimismo, se ha descrito la presencia de uORFs en los mensajeros procedentes de los genes *hac1/hacA* de *T. reesei*. Ambos genes codifican factores de transcripción implicados en la respuesta UPR (Unfolded Protein Response), aunque todavía no existen evidencias de que las uORFs regulen la traducción de los mRNAs (Saloheimo *et al.*, 2003).

7.3. MECANISMOS ALTERNATIVOS A LOS MEDIADOS POR LAS uORFs

Cabe destacar, en eucariotas superiores, la existencia de los denominados **elementos IRESs (Internal Ribosomal Entry Sites)**; que actúan en *cis* y que constituyen un mecanismo de traducción “independiente de cap”, distinto al descrito en el apartado 7.1 de esta introducción (Kozak, 1992, 1999; Sachs, 2000). Los IRESs son secuencias que promueven la entrada del ribosoma en el transcrito, pasando por alto incluso la regulación que pueda ejercer la presencia de uORFs (Kozak, 2001a; Vilela & McCarthy, 2003). Es un mecanismo que depende de la existencia de estructuras secundarias y de secuencias complementarias al rRNA 18S (Figura III.5). Se considera que este tipo de traducción ocurre bajo condiciones de estrés, donde el mecanismo “dependiente de cap” se inactiva (Ashe *et al.*, 2000; Meijer & Thomas, 2002). Hasta el momento su existencia en hongos no está del todo clara, aunque se ha descrito en el gen *YAP1* *S. cerevisiae* (Zhou *et al.*, 2001). Trabajos previos discuten la existencia de traducción mediada por IRES en células de *S. cerevisiae* sometidas a estrés nutricional (Paz *et al.*, 1999).

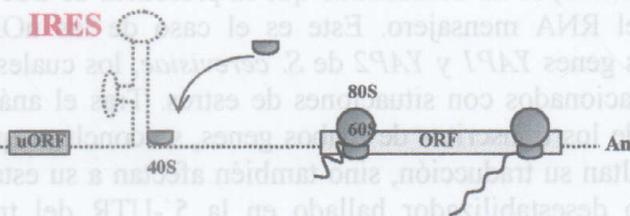


Figura III.5. Mecanismo de acción de las IRES. El inicio de la traducción mediada por estos elementos depende de la existencia en el transcrito de estructuras secundarias, así como de secuencias homólogas a las del rRNA del ribosoma.

Resultados III

1. BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Numerosos han sido los trabajos en donde se han caracterizado genes de *T. harzianum* CECT 2413, que se expresan bajo condiciones de estrés nutricional y presencia de quitina; como los genes *chit42*, *chit33*, *bgn16.2* y *qid74*, entre otros (Dana *et al.*, 2001; Delgado-Jarana *et al.*, 2000; García *et al.*, 1994; Rey *et al.*, 1998).

En el presente trabajo, se aplican nuevas condiciones de cultivo, con el fin inducir la expresión de genes que pudieran estar implicados en la protección del hongo frente a sus propias enzimas líticas, en el reforzamiento de su pared celular, o en la respuesta al estrés nutricional. En el siguiente apartado se detallan las condiciones utilizadas para el análisis de la expresión génica diferencial en *Trichoderma*.

1.1. GENES EXPRESADOS BAJO ESTRÉS NUTRICIONAL Y PRESENCIA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

La búsqueda de nuevos genes se abordó mediante la técnica *Differential Display* (Liang & Pardee, 1997), descrita en el apartado 21 de *Materiales y Métodos*, en la que se analizaron cuatro condiciones de cultivo (Apartado 17.1 de *Materiales y Métodos*). El micelio se cultivó en a) 0.1% de glucosa, que refleja estrés nutricional y donde las enzimas hidrolíticas se expresan activamente; b) 0.1% de glucosa más un preparado de hidrolasas de *T. harzianum* (Lysing Enzymes, SIGMA) a una concentración de 2mg/ml, que originaría un daño en la pared celular del microorganismo; c) 2% de glucosa, donde las enzimas hidrolíticas se hallan reprimidas y el micelio presenta un crecimiento óptimo; y d) 2% de glucosa más el preparado de enzimas hidrolíticas.

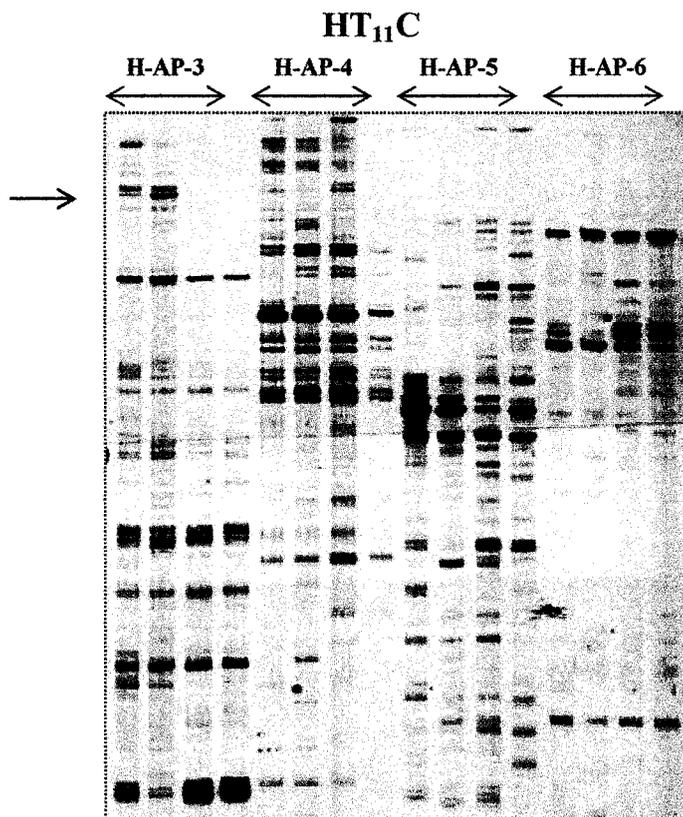


Figura III.6. Gel de *Differential Display*. Se muestra uno de los geles, correspondiente a muestras amplificadas con el oligo-dT (HT₁₁C) y el cebador aleatorio H-AP-3. La flecha indica una banda diferencial, concretamente, la banda perteneciente al clon C34.

Previamente se observó que en cultivos crecidos con una fuente de carbono fácilmente asimilable, como la glucosa, el medio se acidificaba alcanzando valores de pH próximos a 2.5. No obstante, en aquellos cultivos donde las condiciones de crecimiento no eran favorables, el pH se mantenía próximo al inicial del cultivo (pH 5.5). Para evitar los cambios de expresión génica que este factor diferencial pudiera originar, se tamponaron los cultivos con MES 0.2M a pH 6.0.

En la Figura III.6 se muestra uno de los geles donde se aprecia la expresión génica tras 8 horas de incubación, en las condiciones anteriormente mencionadas.

Asimismo, de cada uno de los cultivos realizados se tomaron muestras para su observación al microscopio. Como se aprecia en la Figura III.7, las enzimas hidrolíticas parecen no ejercer efecto sobre el micelio que ha crecido bajo estrés nutricional. En cambio, en presencia de 2% de glucosa, donde genes activos anteriormente, estarían ahora reprimidos, las enzimas hidrolizan el micelio. Este resultado sugiere que en las condiciones de cultivo con 0.1 % de glucosa, se activan genes que podrían estar implicados en la protección o el reforzamiento de la pared celular. Se seleccionaron aquellas bandas que, en ausencia de glucosa, aumentaban su intensidad en presencia de las enzimas líticas, y se reprimían en ausencia de estrés nutricional.

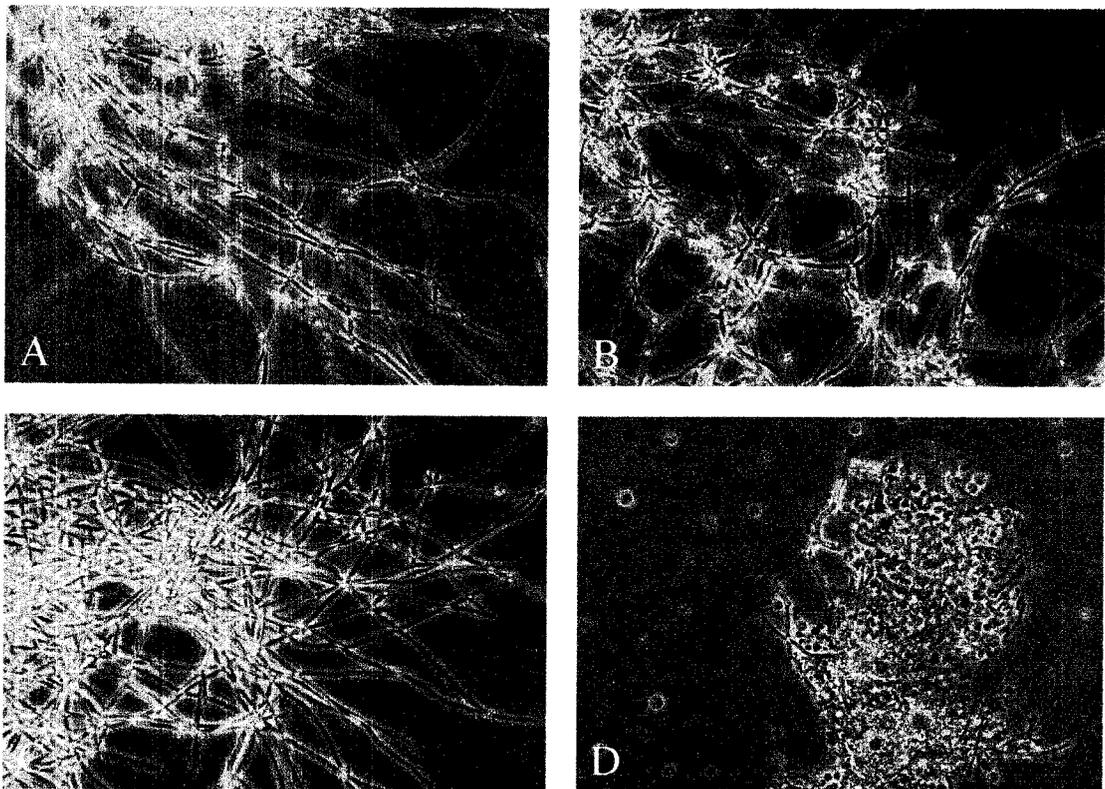


Figura III.7. Micelio de *T. harzianum* tras 8 h de inducción. Las muestras corresponden a cada una de las condiciones de los cultivos utilizadas en el *Differential Display*: A, 0.1 % de glucosa; B, 0.1% de Glucosa + 2 mg/ml de enzimas líticas (Lysing Enzymes, SIGMA); C, 2% de glucosa; D, 2% de glucosa + 2 mg/ml de enzimas líticas.

Tras seleccionar el patrón de expresión, se aislaron tres clones (A44, C11, C34) a partir de las bandas purificadas del gel, cuya inducción se confirmó por northern reverse y northern, en cultivos nuevos crecidos en las mismas condiciones (Figura III.8) [apartado 21.6.1 de *Materiales y Métodos*].

Tras analizar la secuencia de los clones aislados, sólo el clon C34 mostraba homología con precursores de glucoamilasas y ciclodextrin glucanotransferasas (CGTasas) fúngicas. La secuencia analizada de C34 comprendía la zona 3' no codificante del gen y parte de la codificante; ésta última correspondía al dominio de unión al almidón, presente en las enzimas anteriormente mencionadas. El gen, a partir del cual se amplificó el fragmento C34 y que mostraba una expresión diferencial, se denominó *gla66*, por la homología existente con las glucoamilasas fúngicas.

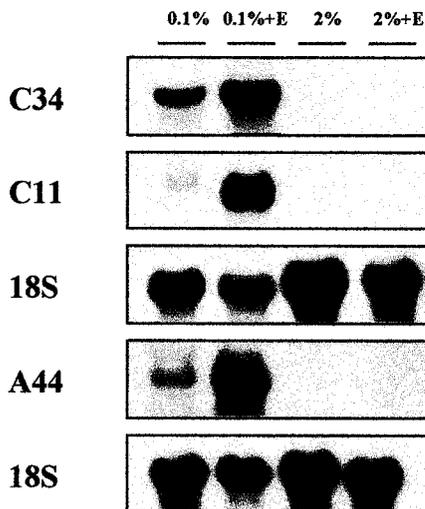


Figura III.8. Northern de los clones aislados por *Differential Display*. Los cultivos se efectuaron en las mismas condiciones: 0.1% de glucosa; 0.1% de glucosa + E (enzimas); 2 % de glucosa y 2% de glucosa + E (enzimas). Como sonda, en cada caso, se utilizó el fragmento de cDNA presente en el gel.

2. ANÁLISIS DE UN GEN DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL: *gla66*

Las glucoamilasas descritas en la literatura intervienen en la nutrición del microorganismo, en la morfogénesis y en el desarrollo (del Río *et al.*, 1997). En *S. cerevisiae* y *L. edodes*, se han descrito glucoamilasas que se inducen específicamente en condiciones de esporulación (Pardo *et al.*, 1986; Zhao *et al.*, 2000). El estrés nutricional al que se somete *Trichoderma* en los ensayos mencionados anteriormente, induce la esporulación lo que podría justificar, en principio, la expresión de *gla66*.

2.1. OBTENCIÓN DEL CLON DE cDNA DE *gla66*

Para llevar a cabo el análisis del gen *gla66* se procedió al aislamiento del clon completo de cDNA. El fragmento de cDNA, obtenido a partir de C34, se utilizó como sonda en el escrutinio de la genoteca de cDNA, construida previamente en el vector Uni-ZAP XR (Apartado 11.2 y 22 de *Materiales y Métodos*). La escisión *in vivo* del

fagémido aislado, permitió obtener el clon pSK-*gla66*, portador del cDNA de *gla66* clonado en el vector pSK, en los sitios de restricción *EcoRI/XhoI*.

La digestión y secuenciación del clon permitió establecer el patrón de restricción del DNA clonado (Figura III.9).

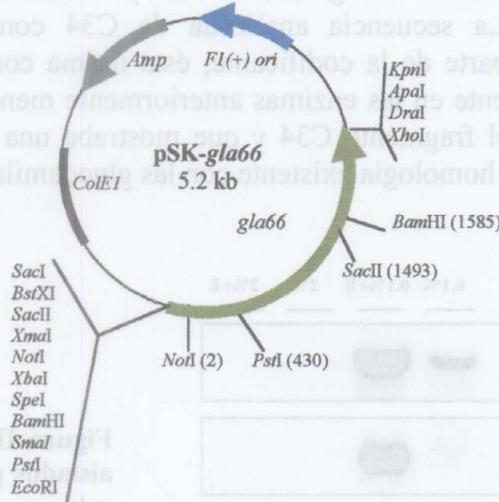


Figura III.9. Mapa de restricción del vector pSK-*gla66*

2.2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL GEN *gla66*

A partir del clon pSK-*gla66* se liberó mediante digestión con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*, el fragmento de cDNA completo del gen *gla66*. Este fragmento, se utilizó como sonda para llevar cabo el análisis Southern. De este modo, se determinó el número de copias de este gen en el genoma de *T. harzianum*. La restricción del DNA genómico de la cepa silvestre, se llevó a cabo con enzimas que no digieran (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *XbaI*) y con las que cortaban una sola vez (*BamHI*, *SacII*) el cDNA de *gla66* (Figura III.9).

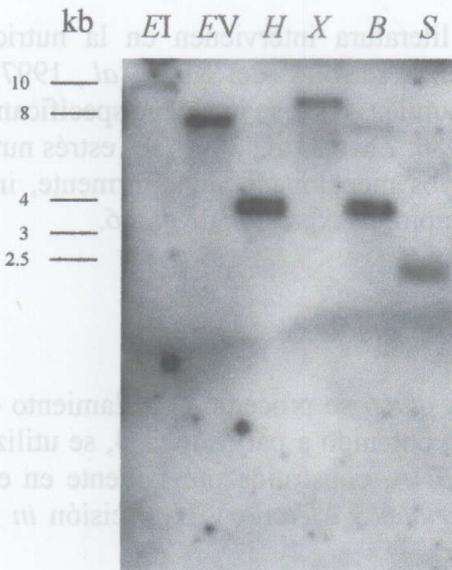


Figura III.10. Análisis Southern del gen *gla66* de *T. harzianum* CECT 2413. Las enzimas de restricción utilizadas en la digestión del DNA genómico, que carecen de diana en el cDNA son: EI, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; H, *HindIII*; y X, *XbaI*. Las enzimas utilizadas que cortan una sola vez el gen *gla66* son: B, *BamHI*; y S, *SacII*.

El análisis Southern (Figura III.10), muestra la existencia de una sola copia de *gla66* en el genoma de *T. harzianum* CECT 2413. No obstante, las condiciones restrictivas bajo las cuales se realizó el ensayo, no permiten descartar la presencia de genes homólogos al *gla66*.

2.3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN *gla66*

El cDNA presente en el clon pSK-*gla66*, consta de 2671 pb y presenta cuatro pautas abiertas de lectura u ORFs (Figura III.11). Aunque se detallará posteriormente en el apartado 5 de *Resultados III*; cabe destacar la existencia de dos orígenes de transcripción en el gen *gla66*. Por un lado se genera un transcrito de 2.67 kb, correspondiente al cDNA clonado en pSK-*gla66* y sintetizado en las condiciones descritas para el *Differential Display*, al que se denomina LT (Long Transcript). Por otro, se transcribe desde un punto 508 pb aguas abajo en el gen, un RNA mensajero de 2164 pb, denominado ST (Short Transcript).

La región líder del transcrito LT cuenta con un par de ORFs discretas de 21 y 23 residuos respectivamente, solapadas entre sí. Aguas abajo, se hallan una pauta de lectura, que codificaría un péptido putativo de 653 residuos. El transcrito ST cuenta con una región líder de 55 bases y presenta una ORF que codifica un péptido putativo de 620 residuos. Teniendo en cuenta la secuencia consenso para el inicio de la traducción en eucariotas descrita por Kozak (1999) y, en concreto la de hongos, la pauta abierta de lectura más favorable es la perteneciente al transcrito ST (Tabla III.3).

El análisis del patrón de antigenicidad de la proteína putativa codificada por el mensajero ST, obtenido según el método descrito por Parker (1986); permitió escoger una zona altamente antigénica utilizada para el diseño del péptido utilizado en la producción de anticuerpos (Figura III.11).

	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6
<i>Eucariotas</i>	C	C	A/G	C	C	A	U	G	G		
<i>Hongos</i>		C	A	C/A	A/C	A	U	G	C		
<i>T. harzianum</i>	T/C	C	A	A	A/C	A	U	G	A/Y	T/G	T/A

Tabla III.3. Secuencia consenso para el inicio de la traducción

Figura III.11. Secuencia del cDNA correspondiente al gen *gla66*. La secuencia amplificada en el *Differential Display*, correspondiente a la banda C34, es la comprendida entre el cebador de secuencia aleatoria, H-AP-3, marcado en azul, y el oligo-dT (HT₁₁C), señalado en verde. Con una flecha roja, se indica el origen de transcripción que genera el transcrito ST, a partir del cual se sintetiza la proteína de 66.2 kDa (marcada en naranja), que presenta homología con glucoamilasas fúngicas. La línea de puntos violeta destaca la región correspondiente al péptido señal de GLA66. En rosa y subrayado, se indica la secuencia antigénica utilizada para la obtención de anticuerpos.

1 GTCTGTCTTACATCCAGCCAGCCCGCTGAAGAGGAGACGACAGAAGGATAGAAGAGCCGAGCAGGAAAGAGCTGAAGAT 80
81 CCCTGCAATTGCCCAACTACTGTTTTATTGCCATCGCCCTGCTTGTCTTTGTTTCTATCCCGCAGCCACTGAGTGCAA 160
161 ACCGCCATATTACGCCGGTTTTTCTTTTTCACAGTTTTCACCGCCCGTCCGGGCACTTGGGCCCCGAGAAATCGGCCCTT 240
241 TCACAGCGTTGGCGCCCTCAGTTCCCC ATG GGG ATG ATC CGC ACA TCC ACT CTT GGC CPT GTA GAC 306
1 M G M I R T S T L G P V D 13
307 CTT TTG TTG TCG GTC CGA GTC GGA CTA AAC TGA GTGTTGAGAGTTGTACCTACGCACGACGTTGGGGG 375
14 L L L S V R V G L N * 24
376 AACAGCTGATCTCATTGGACCAAGTCGGCAAACGAAAGCCGTTGTTGTTATTGCGAGAAGTCTCTGACTCGGGGCGCC 455

456 GTATCATAAAG ATG CCT GCC TTC GCC ATG GAC CTG GCC GCG AGC CAC TCG GCA TCG GCT CTG 517
1 M P A F A M D L A A S H S A S A L 17
518 TCT CTC AAC GTT TCC TCT CAT ACG TCT TCC TTC ATT CCG CCC ATC ATG -CTG -CTG -TCG 577
18 S L N V S S H T S S F I P P I M.....H.....V.....L.....S 37
578 ACT GCT GTG CTA CTT GGC TCA GTT GCC CTC CAA AAA GTT CTG GGA AGA CCA GGA TCA AAC 637
38 T A V L L G S V A V Q K V L G R P G S N 57
638 GGC CTG TCC GGC GTC ACA AAA CGA TCT GTG GAT GAC TTT ATC AAC ACA CAG ACT CCC ATT 697
58 G L S G V T K R S V D D F I N T Q T P I 77
698 GCA CTA AAC AAC CTT CTT TGC AAT GTT GGC CCT GAT GGA TGC CGT GCC TTT GGT ACA TCG 757
78 A L N N L L C N V G P D G C R A F G T S 97
758 GCC GGT GCT GTG ATT GCA TCT CCG AGC ACA ACT GAC CCA GAC TAC TAC TAC ATG TGG ACG 817
98 A G A V I A S P S T T D P D Y Y Y M W T 117
818 CGA GAT AGT GCT CTT TTC AAG AAC ATT TTC GAC CGC TTC ACT CAG CAG TAT GAT GCC 877
118 R D S A L V F K N I V D R F T Q Q Y D A 137
878 GGC CTG CAG CGC CGC ATC GAG CAG TAC ATT TCT GCC CAG GTC ACT CTT CAG GGC ATC TCA 937
138 G L Q R R I E Q Y I S A Q V T L Q G I S 157
938 AAC CCC TCT GGC TCT CTT TCG GAC GGG TCC GGT CTT GGT GAA CCC AAG TTT GAG TTG ACC 997
158 N P S G S L S D G S G L G E P K F E L T 177
998 TTG AGC CAG TTC ACT GGC AAC TGG GGT CGC CCG CAG CGC GAT GGC CCA GCT CTC CGA GCC 1057
178 L S Q F T G N W G R P Q R D G P A L R A 197
1058 ATT GCC TTG ATT GGT TAT TCG AAG TGG CTC ATC AAC AAC AAC TAC CAG TCA ACG GTG TCA 1117
198 I A L I G Y S K W L I N N N Y Q S T V S 217
1118 AAT ATC ATC TGG CCC ATT GTA CGG AAT GAC CTC AAC TAT GTT GCC CAA TAC TGG AAC CAA 1177
218 N I I W P I V R N D L N Y V A Q Y W N Q 237
1178 ACC GGT TTC GAC CTG TGG GAG GAA GTC AAT GGT AGC TCG TTC TTT ACC GTT GCC AAC CAG 1237
238 T G F D L W E E V N G S S F F T V A N Q 257
1238 CAC CGA GCT CTT GTA GGG CGC CAC ACT TGC TGC CAC CCT CGG CCA GTC GGG AAC CAC CTA 1297
258 H R A L V G R H T C C H P R P V G K H L 277
1298 TTC CTC AGT TGC GCC TCA AGA TCC TGT GCT TCC TCC AAA GAT TCT GGG TGT CGG GTG GAT 1357
278 F L S C A S R S C A S S K D S G C R V D 297
1358 ACA TTG ACT CCA CCA TCA CCA CCA ACG AAG GCA GGA CTG GAA AAG ATG CCA ACT CTC TTC 1417
298 T L T P P S P P T K A G L E K M P T L F 317
1418 TCG CAT CTA TCC ACA CGT TCG ATC CTA GCC TCG GGC TGC GAC GCC TCT ACC TTC CAG CCT 1477
318 S H L S T R S I L A S G C D A S T F Q P 337
1478 TGC AGT GAC AAA GCT CTC TCC AAC CTC AAG GTT GTT GTA GAC TCC TTC CGC TCC ATC TAC 1537
338 C S D K A L S N L K V V D S F R S I Y 357
1538 GGT GTC AAC AAG GGC ATT CCC GCT GGC TCT GCT GTC GCC ATC GGC AGA TAC CCC GAA GAC 1597
358 G V N K G I P A G S A V A I G R Y P E D 377
1598 GTG TAC TTT AAC GGT AAC CCC TGG TAT CTC GCC ACG TTC GCT GCT GCC GAG CAA CTT TAC 1657
378 V Y F N G N P W Y L A T F A A A E Q L Y 397
1658 GAC TCC GTC TAC GTC TGG AAG AAG ACA GGC TCC ATC ACA GTG ACT TCC ACT TCT TTG GCC 1717
398 D S V Y V W K K T G S I T V T S T S L A 417
1718 TTC TTC CAG GAG CTC CCG GGC GTC GCA GCT GGA ACT TAC TCC AGC AGC CAG TCT ACC 1777
418 F F Q E L V P G V A A G T Y S S S Q S T 437
1778 TTC ACA AGC ATC ATC AAC GCC GTC TCG ACA TAT GCT GAT GGA TTC CTC AGC GAG GCT GCC 1837
438 F T S I I N A V S T Y A D G F L S E A A 457
1838 AAG TAC GTC CCC GCT GAT GGT TCG CTC GCC GAG CAG TTT GAT CGC AAC ACC GGC ACA CCT 1897
458 K Y V P A D G S L A E Q F D R N T G T P 477
1898 CTG TCA GCT GTT CAC CTG ACC TGG TCG TAC GCC TCG TTT CTC ACC GCC CGC GCC CGT CGG 1957
478 L S A V H L T W S Y A S F L T A A A R R 497
1958 GCT GGC GTT GTC CCC CCC TCG TGG GCC AGC AGT GGC GCC AAC TCA GTC CCT TCA AGC TGC 2017
498 A G V V P P S W A S S G A N S V P S S C 517
2018 TCG GGA GCT TCT GTG GTT GGA TCC TAC TCG CGT CCT ACA GCC AGT CAT TCC ACC ATC GCA 2077
518 S G A S V V G S Y S R P T A S H S T I A 537
2078 CCC CCA AGC GGC GTT CTT GGG TAC TCC TTC ACT TCC CAT TCC TGT GCT ACC CCG ACT TCC 2137
538 P P S G V L G Y S F T S H S C A T P T S 557
2138 GTT GCC GTC ACT TTC CAT GAG CTT GCC CAC ACC AAG TTT GGT CAG ACT ATC AAA GTC GCT 2197
558 V A V T F H E L A A T K F G Q T I K V A 577
2198 GGT AGC GCT CCC GAG CTG GGC AAT GGA GCA CGA CGC CAG CCA TTG CTC TGG ATG CCG TCA 2257
578 G S A P E L G N G A R A Q P L L W M P S 597
2258 ACT ATG CCA CTA ACC ATC CCT TGT GGA TTG GAT CGG TCA ATC TGG AGG CCG GGG ACG TTA 2317
598 T M P L T I P C G L D R S I W R P G T L 617
2318 TCG AGT ACA AGT ACA TCA ACG TGG GCC AGG ATG GTT CCG TCA CCT GGG AGA GCG ACC CCA 2377
618 S S T S T S T S T W A R M V P S P G R A T P 637
2378 ACC ACA CCT ACA CTG TTC CTG CGG TGG CCT GTG TTA CCG AGG TGG TGA AGGAGGATACCTGGCA 2441
638 T T P T L F L R W P V L P R W * 653
2442 GTCATAATAAAGCAAGCCTGAGGATACAGAGTACTGAGCATGAAGTACAGATTGCAGATGGAAGATGGGGATTGA
AATTGCCAATAGAACAGTGGGATACATCGGGCAACCAGTAGGGAAGAATGCTTTCACGATGATCGGTTATAGCATT
AATTAGCCGTTATGAATCAGACATGAATATCCGATCAATATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2671

La secuencia consenso 5'-AATAAA-3', putativa señal de poliadenilación en eucariotas superiores, se halla 21 pb aguas abajo del codón de terminación.

3. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA GLA66

3.1. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA

Como se mencionó en el apartado anterior, a partir del gen *gla66* podrían sintetizarse dos proteínas de 653 (a partir de LT) y 620 (a partir de ST) residuos y con un peso molecular estimado de 69451 Da y 66213 Da, respectivamente.

El perfil hidropático de ambas se analizó según el algoritmo descrito por Kyte & Doolittle (1982). La región amino terminal (desde Met₁ hasta Ser₃₄) de la proteína putativa de 66.2 kDa (GLA66), es hidrofóbica; por lo que probablemente funcione como péptido señal (Figura III.12). En cambio el perfil de la proteína putativa de mayor tamaño sugiere una localización intracelular. Las glucoamilasas son, en general, enzimas extracelulares, aunque existen excepciones, como la codificada por el gen *SGA* de *S. cerevisiae* que es intracelular (Radford *et al.*, 1996).

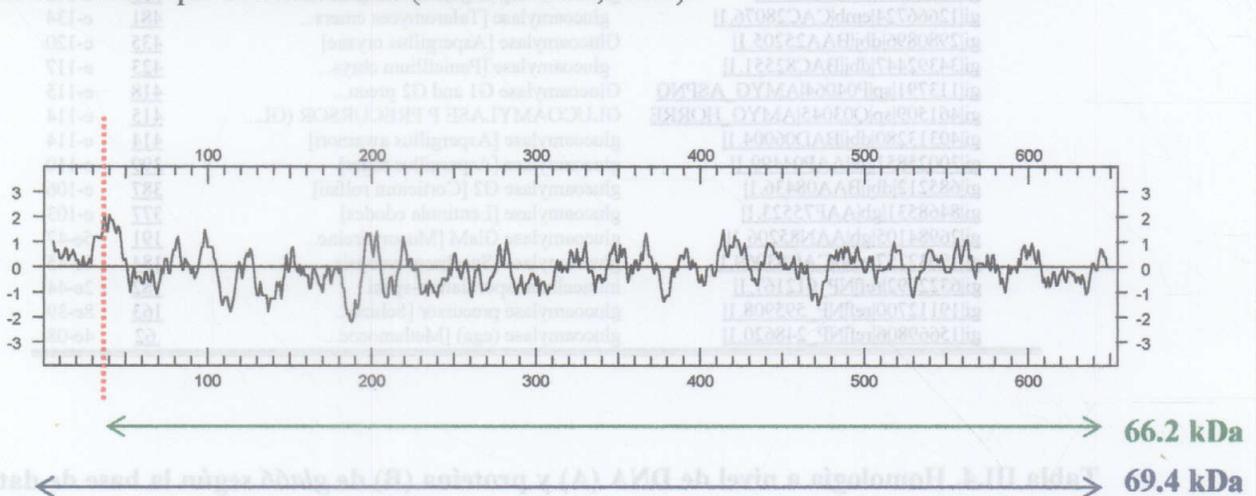


Figura III.12. Perfil de hidrofobicidad de las proteínas codificadas por *gla66*. La barra roja indica el comienzo de la proteína putativa de 66.2 kDa, codificada por el transcrito ST a partir de *gla66*.

Ya que ambas proteínas putativas se hallan en fase y difieren tan sólo en 33 residuos, la composición de aminoácidos que presentan es muy similar. Considerando la secuencia de la proteína de mayor y menor tamaño, respectivamente, los aminoácidos más abundantes son serina (13.2 y 12.6%), alanina (9.5 y 10%), treonina (8.3 y 8.5%) y leucina (8.1% en ambas).

3.2. HOMOLOGÍA CON OTRAS PROTEÍNAS

La búsqueda en la base de datos de secuencias homólogas a *gla66*, se efectuó utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Los resultados obtenidos mostraban homología a nivel de nucleótido con la secuencia del gen *gla-1* de *N. crassa*, que codifica el precursor de una glucoamilasa extracelular (Tabla III.4A). A nivel de proteína presentaba homología con numerosas glucoamilasas, descritas en *N. crassa*, *R. oryzae*, *H. resinae*, *L. edodes* y en el género *Aspergillus*. Asimismo se asemejaba a la glucoamilasa intracelular SGA de *S. cerevisiae* (Tabla III.4B).

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	value
A	emb AL355932.1 NCB5022	Neurospora crassa DNA linkage group...	<u>70</u> 5e-09
	emb X67291.1 NCGLA1	N.crassa <i>gla-1</i> gene for glucan 1,4-alpha...	<u>70</u> 5e-09
B	gi 486943 pir S36364	glucan 1,4-alpha-glucosidase (EC 3.2....	<u>533</u> e-150
	gi 32414953 ref XP_327956.1	GLUCOAMYLASE PRECURSOR (GLUCAN...	<u>531</u> e-149
	gi 3012 emb CAA47707.1	glucan 1,4-alpha-glucosidase [Neuro...	<u>525</u> e-148
	gi 12666724 emb CAC28076.1	glucoamylase [Talaromyces emers...	<u>481</u> e-134
	gi 2980896 dbj BAA25205.1	Glucoamylase [Aspergillus oryzae]	<u>435</u> e-120
	gi 34392447 dbj BAC82551.1	glucoamylase [Penicillium chrys...	<u>423</u> e-117
	gi 113791 sp P04064 AMYG ASPNG	Glucoamylase G1 and G2 precu...	<u>418</u> e-115
	gi 461509 sp O03045 AMYG HORRE	GLUCOAMYLASE P PRECURSOR (GL...	<u>415</u> e-114
	gi 40313280 dbj BAD06004.1	glucoamylase [Aspergillus awamori]	<u>414</u> e-114
	gi 30025851 gb AAP04499.1	glucoamylase [Aspergillus niger]	<u>399</u> e-110
	gi 685212 dbj BAA08436.1	glucoamylase G2 [Corticium rolfsii]	<u>387</u> e-106
	gi 8468531 gb AAF75523.1	glucoamylase [Lentinula edodes]	<u>377</u> e-103
	gi 26984105 gb AAN85206.1	glucoamylase GlAM [Mucor circine...	<u>191</u> 5e-47
	gi 19032257 emb CAC83969.1	glucoamylase [Saccharomycopsis ...	<u>184</u> 6e-45
	gi 6322092 ref NP_012167.1	intracellular sporulation-speci...	<u>182</u> 2e-44
	gi 19112700 ref NP_595908.1	glucoamylase precursor [Schizo...	<u>163</u> 8e-39
gi 15669806 ref NP_248620.1	glucoamylase (cga) [Methanococ...	<u>62</u> 4e-08	

Tabla III.4. Homología a nivel de DNA (A) y proteína (B) de *gla66* según la base de datos BLAST

La homología con α -amilasas y CGTasas, se debe a la presencia en estas enzimas del dominio de unión al almidón o SBD, muy conservado evolutivamente; también presentan características estructurales comunes en el sitio activo de la enzima (Apartados 3 y 4 de *Introducción III*; Coutinho & Reilly, 1997; Svensson, 1988).

Los resultados obtenidos se centraron fundamentalmente en la proteína putativa codificada por el transcrito ST, por la semejanza detectada en la región amino terminal con respecto al resto de glucoamilasas fúngicas.

El alineamiento múltiple de secuencias permite determinar los porcentajes de similitud y de identidad de las glucoamilasas recogidas en los bancos de secuencias con la proteína extracelular codificada por *gla66* (Figura III.13, Tabla III.5).

Especie	Proteína	Identidad (%)	Similitud (%)	Fragmento comparado
<i>N. crassa</i>	precursor de glucoamilasa	55	62	599
<i>A. shirousami</i>	precursor de glucoamilasa	47	59	591
<i>A. niger</i>	precursor de glucoamilasas G1 y G2	47	59	598
<i>A. kawachii</i>	precursor de la glucoamilasa I	47	57	597
<i>A. oryzae</i>	precursor de glucoamilasa	46	56	586
<i>Amorphotheca resiniae</i>	precursor de la glucoamilasa P	45	53	585
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	precursor de glucoamilasa	36	44	435
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	precursor de la glucoamilasa GLA1	35	43	465
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	precursor de la glucoamilasa GLU1	35	42	463
<i>R. oryzae</i>	precursor de glucoamilasa	34	40	455
<i>Arxula adenivorans</i>	precursor de glucoamilasa	33	40	437
<i>S. cerevisiae</i>	glucoamilasa intracelular específica de esporulación	32	40	465
<i>S. cerevisiae var. diastaticus</i>	precursor de la glucoamilasa S1	30	38	428
<i>S. cerevisiae var. diastaticus</i>	precursor de la glucoamilasa S2	30	38	428
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	glicosil hidrolasa putativa	28	20	347

Tabla III.5. Porcentajes de identidad y similitud de GLA66 con otras glucoamilasas

3.3. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCIARIA DE GLA66

En colaboración con el Dr. Julio Polaina del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del C.S.I.C. (Paterna, Valencia), y considerando la homología presentada con otras proteínas, se predijo un modelo estructural para la glucoamilasa extracelular GLA66, teniendo en cuenta el procedimiento seguido en estudios anteriores (Guex *et al.*, 1997, 1999).

En la secuencia de esta enzima se distingue, desde el extremo amino al carboxilo terminal: la región correspondiente al péptido señal, que contribuye a la exportación de la proteína; el dominio catalítico, donde se localiza la secuencia conservada DLWEEV, implicada en el mecanismo catalítico; la región bisagra o linker; y el dominio de unión al almidón o SBD (Figura III.14). La estructura resulta similar a la de las glucoamilasas descritas (Radford *et al.*, 1996).

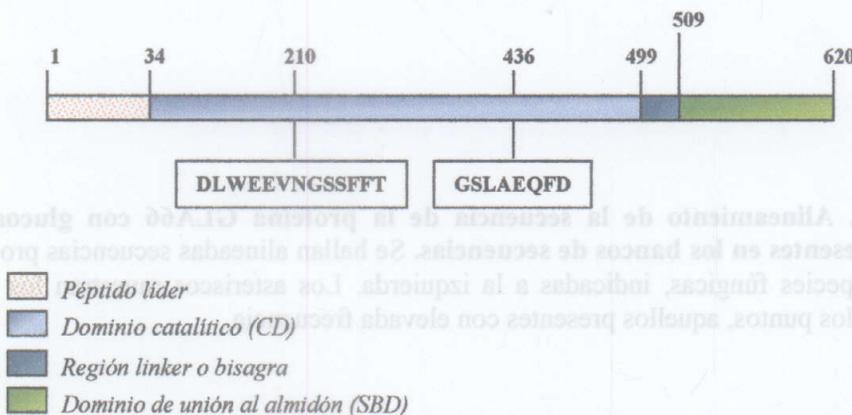


Figura III.14. Estructura de la glucoamilasa GLA66. Los residuos conservados E210 y E436, probablemente estén implicados directamente en la hidrólisis del almidón.

El dominio catalítico esta constituido, como en el resto de glucoamilasas, por una estructura de barril rica en α -hélices (Figura III. 15A), donde se localiza el sitio activo de la enzima (Figura III. 15D; apartado 4.1 de *Introducción III*; Sauer *et al.*, 2000). La proximidad de los residuos catalíticos está en torno a 8Å (Figura III. 15B), acorde con lo descrito en trabajos previos (McCarter & Withers, 1994; Sauer *et al.*, 2000).

El SBD presenta estructuras de hoja plegada- β (Figura III. 15C), la cual es imprescindible para el reconocimiento y la unión al sustrato (Apartado 4.1 de *Introducción III*; Giardina *et al.*, 2001).

4. ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *gla66*

4.1. CLONACIÓN DEL DNA GENÓMICO DE *gla66*

Para el aislamiento del clon genómico de *gla66*, se efectuó un escrutinio en la genoteca de gDNA de *T. harzianum* construida en el vector LambdaGEM[®]-11. Como sonda se utilizó el cDNA completo del gen, aislado a partir del vector pSK-*gla66* tras digerir con *EcoRI/XhoI* (apartado 11.1 de *Materiales y Métodos*). Se aislaron dos fagos positivos independientes, $\Phi 1$ y $\Phi 4R$.

A partir de $\Phi 1$, se purificó el DNA y se digirió con distintas enzimas de restricción (Figura III.16A), teniendo en cuenta que los fragmentos de DNA genómico se clonaron en el sitio de restricción *BamHI* de los brazos del fago (apartados 4.2 y 9 de *Materiales y Métodos*). Los fragmentos obtenidos tras la digestión se separaron por tamaño en un gel de agarosa y se transfirieron posteriormente a una membrana de nylon. Se procedió a efectuar un análisis Southern, donde se utilizó el cDNA de *gla66* como sonda, para diferenciar qué fragmentos contenían DNA genómico de este gen (Figura III.16B). De los que resultaron positivos, se seleccionó y purificó el fragmento de 4 kb liberado tras la digestión con la enzima. Este fragmento se subclonó en el vector pSK y se secuenció posteriormente. El DNA genómico de este clon, comprendía el promotor y parte de la secuencia 5' codificante del gen *gla66*.

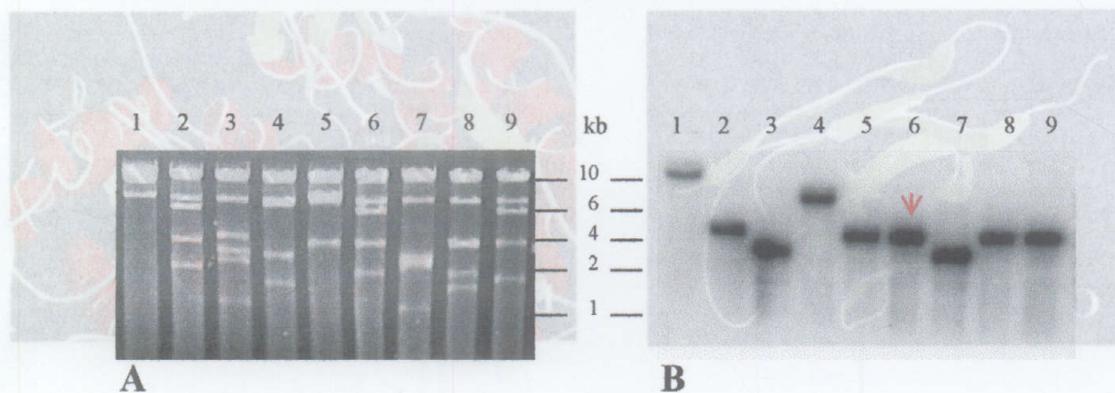


Figura III.16. Obtención del clon de gDNA correspondiente a *gla66*. El DNA del fago $\Phi 1$ se digirió con las siguientes enzimas de restricción: 1, *SacI*; 2, *SacI/XhoI*; 3, *SacI/BamHI*; 4, *SacI/EcoRI*; 5, *SacI/XbaI*; 6, *XhoI*; 7, *XhoI/BamHI*; 8, *XhoI/EcoRI*; 9, *XhoI/XbaI*. A, gel de agarosa con los fragmentos obtenidos tras la digestión; B, análisis Southern de los fragmentos utilizando el cDNA de *gla66* como sonda. La flecha indica el fragmento de gDNA seleccionado.

4.2. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA PROMOTORA

En el promotor del gen *gla66*, se identificaron secuencias consenso putativas, que podrían estar implicadas en la regulación de la expresión de este gen (Figura III.17).

Por un lado, se distinguen cajas putativas de unión al factor de transcripción PacC, que interviene en la regulación de la expresión génica por pH en *Aspergillus* y otros hongos (Tilburn *et al.*, 1995; Tréton *et al.*, 2000).

Otra de las secuencias halladas es la 5'-HGATAR-3', a la que se une el factor AreA en *Aspergillus* (Muro-Pastor *et al.*, 1999), que interviene en la regulación por fuente de nitrógeno. La carencia de este nutriente ha sido descrita en *T. harzianum* como un factor importante en la regulación de genes como *chit33* (Dana *et al.*, 2001).

Por otro lado, la represión por catabolito de carbono parece ser una característica de las enzimas hidrolíticas de *Trichoderma* y de otros hongos. La existencia de secuencias consenso 5'-SYGGRG-3' en el promotor de *gla66*, las cuales están relacionadas con el factor de transcripción CreA en *Aspergillus* (Cubero & Scazzocchio, 1994), sugiere que este gen está sometido a represión por glucosa, acorde con el patrón de expresión hallado por *Differential Display* (Figura III.8). Recientemente se ha clonado en *Trichoderma* el factor de transcripción Cre1, homólogo a CreA (Ilmén *et al.*, 1996a).

Otro de los motivos hallados en el promotor de *gla66* es el 5'-CTTCC-3', descrito en la región reguladora de varios genes de enzimas glicolíticas de levadura, como la piruvato kinasa y la aldehído deshidrogenasa, a la cual se une la proteína GCR1 (Huie *et al.*, 1992).

Asimismo, se distinguen cajas STRE con secuencia 5'-WAGGGG-3', que intervienen en la respuesta general a estrés en *S. cerevisiae*, y a las que se unen los factores Msn2p y Msn4p (Ruis & Schüller, 1995). En *T. harzianum* P1 se ha descrito recientemente el factor de transcripción Seb1, homólogo a los Msn2p/4p de *Saccharomyces* (Peterbauer *et al.*, 2002b).

En cuanto a la regulación descrita en otras glucoamilasas fúngicas, cabe destacar la caja GC (5'-CGGGC-3') situada en la denominada *región IIIa* de algunos promotores de genes amilolíticos, como el *glaB* de *A. oryzae*; que parece estar implicada directamente en la activación por maltosa (Gomi *et al.*, 2000; Ishida *et al.*, 2000). En la secuencia reguladora de *gla66* se localizan varias de estas cajas, aunque el contexto no guarda las características descritas en *Aspergillus*. Por otro lado, existen estudios en *A. oryzae* que refieren regiones consenso a las que se une el factor de transcripción AmyR, las cuales intervienen en la activación de la transcripción por maltosa y almidón en numerosos genes amilolíticos (Gomi *et al.*, 2000). Estas secuencias, 5'-CGGN₉CGG-3', 5'-CGCN₉CGC-3' y 5'-CGGN₉CGC-3', constan de una región central rica en AT. En el caso de *gla66* encontramos la secuencia 5'-CCGCCATATTCAGCCG-3', que se asemeja a la primera de ellas y que podría estar implicada en la activación por maltosa de este gen. La localización de este motivo es favorable, pues se sitúa entre los dos orígenes de transcripción existentes en este gen, analizados posteriormente en el apartado 5.1 de *Resultados III*; previo al origen a partir del que se transcribe el gen en presencia de maltosa.

4.2. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA PROMOTORA

-1989 TTTTTTCCAAGCCGTCGGCCGATGAGGTTGAGGAAAACCATGGGTTGCCTACATCACGATGCTGG -1923
 -1922 TACTCCGTATTTGCATTTCTGCAGCGGCCGTTGAGCCTCATGTTAGCCTTCTGACCCGATGGTGCC -1856
 -1855 ATCTGACTAGCTGTACGGAGTAAATATGATTAATTGTGCAACGGGGACGATGAAAAAACATGCAC -1789
 -1788 GAAGTAACCCCGATGAATCGGGCGT **GGAAG**AAAGGATCCCTTGTGGTGGGCAAATGGGAGACTG -1722
 -1721 CTTACATGCCTCGTGACAAGTTTCGT **CGGGC**CACGGCAAGCCTCTTGGGATTCTGTCACTGGTGAT -1655
 -1654 **AATT**GGCTGTATGATGACAATATGTTGGCTGTGTGTTGGAGCAAACGCACCAAACACCTCATCCAGC -1588
 -1587 CTAGCTTGGCGTGTGCTTGGATGAGTTTGATTACTTACTCCATCGCGCCTCAATGCATGTGAAGAT -1521
 -1520 CTACCTCAAAGGAGCAGCTTGGCTACGACGCATTACCTCATGCAGGCCGGCCCTTTTTCTGTCCC -1454
 -1453 TTTTCTCCGCTTACACCATGTTCTTGTCTTCTCCCATCTCCAGCACGTGTGAGGCAGCGA **GGA** -1387
 -1386 **GCTCGGCCTTGGC**ACAGAGATCCAGACGCATATGCGAAGATCTTGGTCCACTGCAGGCTGTCACTA -1320
 -1319 CGAGCCCTCGGTTGCTTGTGAAACCCAACCTCAGCTCTCCAGAGTTCGTAGTAACGCCGACTCGGCG -1253
 -1252 TCTTCTGCGCCACATCCACGGAACCTGATGATGCTAGAAGCTGAAAATTTTTCTAATTGATGCCGT -1186
 -1185 CTCGCCCATCTTGTGCTTCTGGTAGGCACCAGACACGTGCTATCAATGCAGAACACACAAAAGTT -1119
 -1118 CCGGCTGTGTAGATGGGATTTCGCAAATTCGAGGCCGTCGAGTCTAGGGTAGGGCGACTAGTACCGG -1052
 -1051 AGGCTAGAGGCGGTAGTGGGCGGGAACTGGCAACTGCAATTCAGAAGAGACATGAGCCGGGATG -985
 -984 CTGCCCACGGGGAGTTGGAGATCGGGAGCA **CCCC**TTGGAGCTGTTG **GGAAG**CTTGTCTGGAGC -918
 -917 TTTTGTGACTATCGCTGGTTCGTTTTTCGCTTCTTCTCACCGTGTCTTGGATGCTAGCCGATGGCC -851
 -850 TGCCTGCTCCCTGCTCCCTTGTCCCTGCCTGCCTCCCCTCCC **CCCC**TTAGCTGCGCATGTTCT -784
 -783 CCTGACAGCGTGACTAATGACGCGTTGCCAGCCTATTGCCTGACGCATCCTGGCATCTGAGTCTA -717
 -716 GCTCGTCACGCTGACCAGGCAGAGCAGCAAGCCG **CGGGC**ATG **ATTGG**GCCGTGC **CCTGGC**TGGCAT -650
 -649 CAGCTGGCCATCCGCTGCCACCCGAGACCACATCACCGACTCGTCGGATCTCTCCGAGAAGGAGCT -583
 -582 GATCCTGGGCAGCGAGACGATTGAAAAAGGCCGTCAGATCCCCTATTTCAGAGGGAAAGAGAGAGAG -516
 -515 AGGCTGCTCTGTCTTACATCCAGCC **AGCCCG**CTGAAGAGGAGACGACAGAAGGATAGAAGAGCCG -449
 -448 AGCAGGAAAGAGCTGAAGATCCCTGCAATTGCCCACTACTGTTATTGCCATCGCCGCTGCTTGCT -382
 -381 CCTTTGTTTTCTATCCCGCAGCCACTGAGTGCAAA **CCGCCATATCAGCCG**GCTTTTCTTTTCACAG -315
 -314 GTTTGCAC **CCCCGT**CGCGGCACCTTGG **CCCCGG**GAGAATCGGCCCTTTCACACGTTGCGGCTCAGT -248
 -247 TCCCCATGGGGATGATCCGCACATCCACT **CCTGGC**CCTGTAGACCTTTTGTGTGCGTCCGAGTCG -181
 -180 GACTAAACTGAGTGTGAGAGTTGTACCTACGCACGACGTT **CGGGC**ACAGCTGATCTC **ATTGGA** -114
 -113 CCAAGTCGGCAAACGAAAGCCGTTGTTGTTATTGCGAGAAGTGCTCTGACTCGGGGCGCCG **TATC** -47
 -46 **ATAAA**GATGCCTGCCTTCGCCATGGA **CCTGGC**CGCGAGCCACTCGGCATCGGCTCTGTCTCTCAAC +20
 +21 GTTTCCTCTCATACGCTTCTCCTTCATTCCGCCATC **ATG** +59

Figura III.17. Secuencia promotora del gen *glab6*. En color naranja se indica el codon de iniciación de GLA66. Las flechas de color rojo indican inicios de transcripción existentes en este gen (Apartado 5 de *Resultados III*). Las secuencias consenso detalladas corresponden a: **5'-GCCARG-3'**, secuencia consenso de unión a PacC; **5'-HGATAR-3'**, secuencia consenso de unión a AreA; **5'-SYGGRG-3'**, secuencia consenso de unión a CreA; **5'-CGGGC-3'**, secuencia de la *región IIIa* de *glab*; **5'-WAGGGG-3'**, caja consenso STRE, de unión a Msn2p/4p; **5'-CCGN₃CCG-3'**, secuencia consenso de unión de AmyR; **5'-CTTCC-3'**, secuencia consenso de unión a GCR1; **5'-CCAAT-3'**, secuencia activadora de la transcripción. En verde se señala la secuencia próxima a lo que podría ser la caja **TATA**.

Por último, cabe destacar las regiones consenso activadoras de la transcripción, 5'-CCAAT-3', presentes en el promotor de *gla66*. A esta secuencia, que aparece en levaduras, hongos y mamíferos, se une un complejo heterotrimérico, que en el caso de levaduras, está constituido por las subunidades HAP2, HAP3 y HAP4. Esta caja consenso se ha descrito en otros genes de *Trichoderma*, como los correspondientes a dos xilanasas, a una celobiohidrolasa y a una quitinasa (Dana *et al.*, 2001; Zeilinger *et al.*, 1996, 1998). Asimismo, la región 5'-TATCTATAAAA-3', presente en la posición -42 con respecto al origen de transcripción del mensajero ST, podría actuar como caja TATA en la transcripción, aunque difiere del consenso descrito para este motivo (revisado por Pugh, 2000).

Respecto al origen de transcripción situado aguas arriba en el promotor, no se halla un motivo TATA que se asemeje al consenso.

5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *gla66*

Atendiendo a la regulación descrita para las glucoamilasas de otros hongos y considerando las secuencias consenso putativas presentes en el promotor de *gla66*, se procedió a analizar la expresión de este gen.

5.1. EFECTO EJERCIDO POR LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA EXPRESIÓN DE *gla66*

La expresión de las glucoamilasas está sometida a represión por catabolito de carbono y a inducción por sustrato (Radford *et al.*, 1996), como ocurre en otras hidrolasas en *T. harzianum* (Dana *et al.*, 2001; García *et al.*, 1994).

Para analizar la influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de *gla66*, se utilizaron sustratos cuyos efectos se habían descrito previamente en *Trichoderma*, así como en la regulación de otras glucoamilasas fúngicas (Benítez *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 2000b; Radford *et al.*, 1996).

Como se muestra en la Figura III.18A, la aparición de los dos transcritos a partir de *gla66* (ST y LT), está influida por la fuente de carbono utilizada. La síntesis del mensajero LT, parece estar sometida a condiciones de estrés nutricional, como baja concentración de fuente de carbono (0.1%) o fuentes de difícil asimilación (quitina, rafinosa y lactosa). Trabajos previos consideran la desrepresión de determinados genes de enzimas hidrolíticas en *Trichoderma* bajo estas condiciones; aunque la quitina, por otro lado, también se considera como inductor de quitinasas (Dana *et al.*, 2001; García *et al.*, 1994). El transcrito de menor tamaño (ST) se induce notablemente en presencia de maltosa, que promueve la expresión de numerosas glucoamilasas fúngicas (Gomi *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2000b).

La transcripción de *gla66* se reprime en presencia de glucosa, mientras que el glicerol actúa como fuente de carbono neutra, como se ha descrito previamente en otros genes de *Trichoderma* (Henrique-Silva *et al.*, 1996; Ilmén *et al.*, 1996b, 1997).

Los resultados indican que la expresión de *gla66* se reprime por catabolito de carbono; se induce por sustrato, generando el transcrito de menor tamaño (ST); y se desreprime en condiciones de estrés nutricional, generando mayoritariamente el transcrito LT.

El análisis western del medio de cultivo, confirma la existencia de una glucoamilasa extracelular en condiciones de inducción (Figura III.18B), cuando el transcrito ST está presente. Estos resultados concuerdan con la actividad enzimática hallada en el medio de cultivo, en las mismas condiciones (Figura III.18C).

En cambio, no se detecta enzima extracelular, ni la actividad correspondiente en condiciones en las que se halla exclusivamente el transcrito LT (Figura III.12). Aunque se ha descrito la existencia de glucoamilasas intracelulares (Pardo *et al.*, 1987; Radford *et al.*, 1996), tampoco se ha detectado actividad intracelular asociada a la fracción soluble (Figura III.18C).

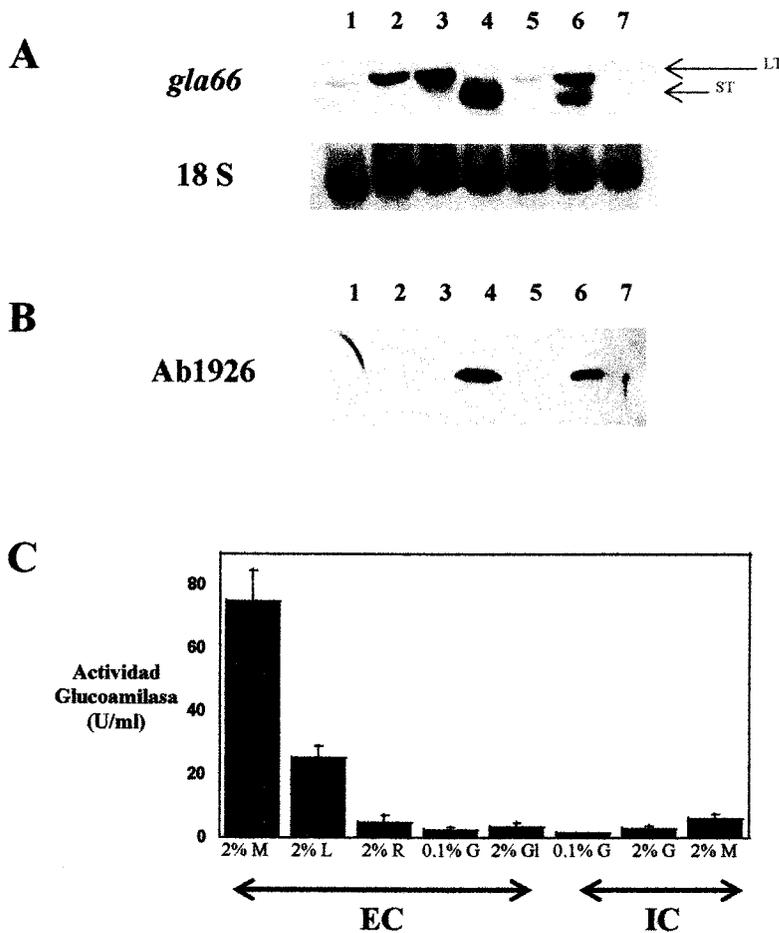


Figura III.18. Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de *gla66*. A, análisis northern de la expresión de *gla66* bajo distintas condiciones: 1, 0.5% de quitina; 2, 0.1% de glucosa (G); 3, 2% de rafinosa (R); 4, 2% de maltosa (M); 5, 2% de glicerol (Gl); 6, 2% de lactosa (L); y 7, 2% de glucosa. B, análisis western de los sobrenadantes obtenidos a partir de las mismas condiciones de cultivo. Se utiliza el anticuerpo Ab1926 en una dilución 1:5000. C, Actividad glucoamilasa detectada en los sobrenadantes (EC) y en los extractos intracelulares solubles (IC) del microorganismo, bajo las condiciones de cultivo mencionadas. Como unidad de actividad glucoamilasa (U) se considera la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1 μ mol de glucosa por minuto.

5.1.1. Análisis de extractos intracelulares y extracelulares

Para determinar si se sintetizaba una glucoamilasa intracelular a partir del transcrito LT, se realizó un análisis western, considerando la fracción proteica soluble y la total, obtenida de micelio crecido en las condiciones descritas en el apartado anterior.

El anticuerpo utilizado, Ab1926, reconoce únicamente la zona antigénica del extremo amino terminal de la proteína extracelular (Figura III.11), por lo que podría ser incompleta la información derivada de los ensayos. Por ello, el análisis se realizó además con un anticuerpo policlonal, AnGL, que reconocía los dominios presentes en la proteína completa. Este anticuerpo se obtuvo frente a la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (Birte Svensson, Departamento de Química del Laboratorio Calsberg, Copenhague, Dinamarca). La conservación entre los dominios de las enzimas amilolíticas y la elevada homología presente entre la glucoamilasa GLA66 y la de *Aspergillus*, permitió utilizar exitosamente este anticuerpo en *Trichoderma*.

Como se observa en la Figura III.19, a partir del mensajero LT no se sintetiza ninguna glucoamilasa intracelular de mayor peso molecular que GLA66, así como ninguna proteína procedente de la proteólisis de algún putativo precursor, como se describió previamente en el caso de las glucoamilasas G1 y G2 de *A. niger* (Svensson *et al.*, 1986).

En presencia de maltosa, se detectan niveles intracelulares bajos de GLA66, que procederían de la proteína que se exporta o bien, de proteína asociada a la pared celular. Recientemente se ha descrito la presencia de glucoamilasas extracelulares en la pared celular del extremo de las hifas y de los septos en *Aspergillus* (Gordon *et al.*, 2000a; Gordon *et al.*, 2000b; Khalaj *et al.*, 2001).

Las bandas inferiores a 66 kDa, se deben probablemente a la presencia de anticuerpos inespecíficos en el suero, purificado frente a la proteína de fusión GST::GLA66; o bien a la existencia de proteínas con epitopos similares. Considerando que el gen *glab6* está reprimido en presencia de glucosa al 2%, las bandas detectadas serían inespecíficas. Además, es poco probable que las bandas detectadas en condiciones de 0.1% de glucosa procedan de un mismo precursor proteico, ya que la probable hidrólisis localizada en la región linker o bisagra, generaría un péptido de peso molecular superior a los hallados. Por otro lado, el transcrito LT no se detecta en condiciones de maltosa al 2% tras 8 h de inducción, lo que sugiere que las bandas presentes en el western por debajo del tamaño de GLA66 son inespecíficas.

El análisis realizado con el anticuerpo AnGL, confirma la presencia de GLA66 intracelular en condiciones de inducción por maltosa. El reconocimiento de diversas proteínas en el sobrenadante sugiere la presencia de otras enzimas amilolíticas, que se inducen junto con la glucoamilasa. Las enzimas amilolíticas comparten características estructurales, como el dominio de unión al almidón, presente en muchas de ellas, por lo que podrían ser reconocidas por este anticuerpo policlonal. Numerosos trabajos describen la producción de amilasas y otras enzimas amilolíticas, bajo las mismas condiciones de inducción de las glucoamilasas; este hecho produce un efecto sinérgico que potencia la tasa de hidrólisis del sustrato (Radford *et al.*, 1996).

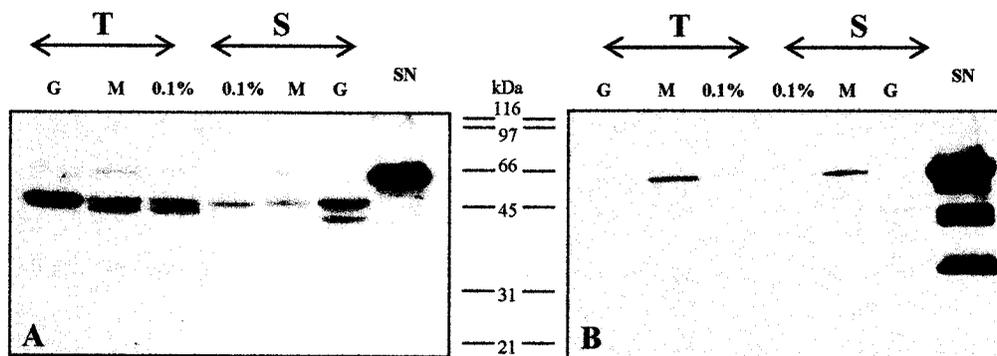


Figura III.19. Análisis western de los extractos intra y extracelulares. Immunodetección realizada con el anticuerpo Ab1926 (A) y con el AnGL (B). Se utilizan los extractos totales (T) y solubles (S), obtenidos a partir de micelio crecido en las siguientes condiciones: G, 2% de glucosa; M, 2% de maltosa y 0.1%, 0.1% de glucosa. Como control positivo se utiliza el extracto procedente del sobrenadante de un cultivo inducido (SN).

5.2. EFECTO EJERCIDO POR EL ESTRÉS SOBRE LA EXPRESIÓN DE *gla66*

La expresión del transcrito LT a partir de *gla66*, se detecta en condiciones similares a las existentes en el micoparasitismo, así como en estrés nutricional. Este hecho, junto con la existencia de dos cajas o elementos STRE putativos en la región promotora del gen (Figura III.17), condujo a determinar si la expresión de *gla66* se inducía asimismo por otros factores.

Trabajos previos demostraron que en *Trichoderma* la expresión de genes de hidrolasas, como el *ech42* y el *chit33*, estaba influida por determinadas condiciones de estrés; generándose una respuesta en tiempos cortos de exposición (Dana *et al.*, 2001; Goller *et al.*, 1998a; Mach *et al.*, 1999).

Como se observa en la Figura III.20, la escasez de fuente de nitrógeno, la aparición de metales pesados o las bajas temperaturas inducen la expresión del mensajero LT en detrimento del ST. Trabajos previos demostraron la inducción por bajas temperaturas de los genes *chit33* y *ech42* de *T. harzianum*, lo que se relacionó con la adaptación del microorganismo al medio (Dana *et al.*, 2001; Mach *et al.*, 1999). La expresión en medio de cultivo con niveles bajos de nitrógeno, descrita previamente en el gen *chit33* de *T. harzianum* (Dana *et al.*, 2001), podría estar relacionada con los motivos GATA putativos del promotor de *gla66* (Figura III.17).

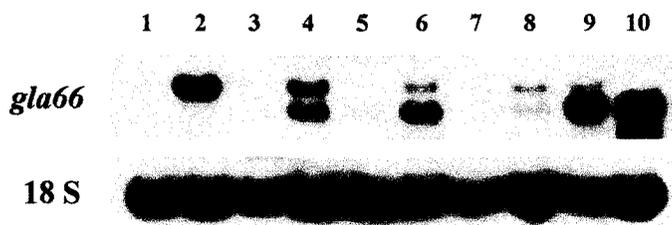


Figura III.20. Expresión de *gla66* bajo condiciones de estrés. Los diversos agentes estresantes se aplicaron, durante 2 horas, sobre cultivos crecidos en MM con 1% de glicerol, condición utilizada en trabajos previos con otras hidrolasas de *T. harzianum* (Goller *et al.*, 1998a; Mach *et al.*, 1999). En el análisis northern se utilizaron las siguientes condiciones: 1, 2% de glucosa, 2h de inducción; 2, 0.1% de glucosa, 8h de inducción; 3, 2% de H₂O₂; 4, baja concentración de NH₄⁺ (1:100); 5, 1 M de sorbitol; 6, CdSO₄ 50 µg/ml; 7, 40 °C; 8, 4 °C; 9, 0.2% de glucosa, 2 h de inducción; y 10, 2% de maltosa, 8 h de inducción.

El choque osmótico, el estrés oxidativo y las altas temperaturas, inhiben la expresión de *gla66*. El sorbitol ha sido descrito, como una fuente neutra y/o represora en *Trichoderma* (Kubicek & Penttilä, 1998); aunque, a concentraciones altas, promueva la expresión de otros genes en *Trichoderma*, como el gen *ech42* de *T. atroviride* (Mach *et al.*, 1999).

Los elementos putativos STRE hallados en el promotor de *gla66*, podrían estar implicados en la síntesis de una glucoamilasa extracelular en las etapas iniciales del estrés nutricional y fisiológico, lo que contribuiría a la utilización rápida de nutrientes en condiciones de crecimiento limitantes.

El efecto ejercido por el estrés sobre el gen *gla66*, se observa tras un período corto de exposición, como ha sido descrito previamente para otros genes de *Trichoderma* (Goller *et al.*, 1998a). La cinética de expresión muestra que la transcripción del mensajero ST se sustituye por la del LT bajo estrés nutricional (0.1 %) en tan sólo 4 h, estabilizándose posteriormente (Figura III.21). La expresión a tiempo cero, podría deberse al estrés sufrido por el micelio en el proceso de filtrado y lavado, previo a la reinoculación y a la posterior adaptación en el medio nuevo.

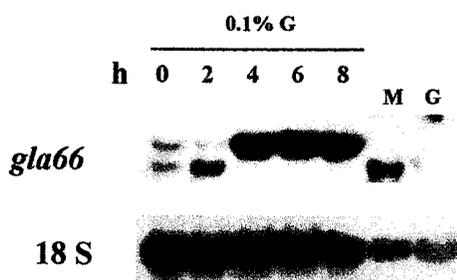


Figura III.21. Cinética de expresión de *gla66*. El micelio se cultivó en MM con 0.1% de glucosa (0.1% G) entre 0 y 8 horas, analizando la expresión de *gla66* cada 2 horas. Como controles se utilizaron cultivos en MM con maltosa al 2% (M) y glucosa al 2% (G) como fuentes de carbono.

5.3. REGULACIÓN POSTTRANSCRIPCIONAL DE *gla66*

5.3.1. Análisis de de los transcritos generados a partir de *gla66*

Con el fin de esclarecer si el transcrito ST se originaba por un procesamiento alternativo a partir del LT, como se describió inicialmente para las glucoamilasas G1 y G2 de *A. niger* (Boel *et al.*, 1984a); o bien se sintetizaban a partir de dos orígenes de transcripción distintos, se efectuó la técnica de RACE (Apartado 23 de *Materiales y Métodos*).

Se escogieron las siguientes condiciones de cultivo: por un lado 2% de lactosa y 8h de incubación, en la que están presente ambos transcritos; y por otro, 0.1% de glucosa y 2% de maltosa durante 8 h, en las que están presente los transcritos LT y ST, respectivamente. A partir de RNA obtenido de estos cultivos, se realizaron diversas amplificaciones utilizando cebadores específicos, con el fin de analizar la secuencia completa de cada transcrito. De cada uno de ellos se obtuvieron las siguientes construcciones: pGRacer5'-R1662, pGRacer5'-R481, pR478-GRacer3' (Apartado 3.1.2 de *Materiales y Métodos*).

Los resultados indican que ambos RNA mensajeros, LT y ST, se sintetizan a partir de dos orígenes de transcripción distanciados 508 pb en el gen (Figura III.22).

La región 5' no codificante del transcrito LT contiene codones de iniciación de la traducción (uAUGs), que generan uORFs putativas. Existen dos uAUGs próximos, que constituyen las uORF1 y uORF2, de 23 y 21 residuos, respectivamente. Aguas abajo se sitúan las uORF3 y uORF4, que solapan en fase con la pauta de lectura correspondiente a GLA66. Las uORFs 1 y 2 presentan características propias de secuencias que influyen negativamente en la traducción (Vilela & McCarthy, 2003), por lo que podrían estar implicadas en la regulación posttranscripcional del transcrito LT. Por un lado, muestran una destacada proporción de codones poco frecuentes en *Trichoderma* (Goldman *et al.*, 1998); por otro, la longitud de la secuencia es notable (Luukkonen *et al.*, 1995); y, por último, presenta un alto contenido G/C tras el codón de parada (Grant & Hinnebusch, 1994).

El análisis de la secuencia del transcrito ST, indica que a partir de éste se sintetiza la glucoamilasa extracelular GLA66, ya que no existen secuencias putativas

reguladoras de la traducción en su región líder; lo que confirma los resultados obtenidos anteriormente (Figura III.18 y III.19).



Figura III.22. Orígenes de transcripción en *gla66*. Las flechas rosas marcan los orígenes de transcripción del gen *gla66*, que dan lugar a los transcritos LT y ST. En color azul, se representan los uAUGs y uORFs existentes en la región 5' no codificante del mensajero LT. En verde, se indican los codones poco frecuentes en *T. harzianum*. La línea discontinua roja, muestra la secuencia adyacente al codón de terminación. En color naranja se indica la ORF correspondiente a la proteína GLA66.

5.3.2. Regulación posttranscripcional mediada por uORF

Con objeto de esclarecer si las uORFs presentes en la región 5' no codificante del transcrito LT regulaban su traducción, se realizó un estudio en el sistema heterólogo *S. cerevisiae*, en el que se había puesto a punto previamente este tipo de análisis (Vilela *et al.*, 1998). Se realizaron diversas construcciones en el vector puY1 (Apartado 3.1.2 de *Materiales y Métodos*), que contiene el gen marcador de la luciferasa bajo la regulación de la zona 5' no codificante del gen *YAP1* de *S. cerevisiae* (Figura III.23). La transcripción en este vector viene mediada por el promotor constitutivo P_{TEF} de levadura. La región líder de *YAP1* se halla subclonada en las dianas *Bam*HI/*Nde*I, entre el promotor y el gen marcador, por lo que modula la traducción del transcrito correspondiente al gen marcador.

Considerando la secuencia del transcrito LT se diseñaron, por un lado, cebadores específicos orientados que amplificaran la región líder del transcrito LT; y, por otro, que introdujeran las mutaciones deseadas en ésta. A partir del clon pSK-gXhoI, se obtuvieron las versiones de la región 5' no codificante descritas en la Tabla III.6. Los cebadores diseñados, así como el proceso de obtención de estas construcciones, se detallan en el Apartado 8 de *Materiales y Métodos*.

La región 5'-UTR de *YAP1* se eliminó del vector por digestión y se sustituyó por las diseñadas a partir del transcrito LT (Figura III.23).

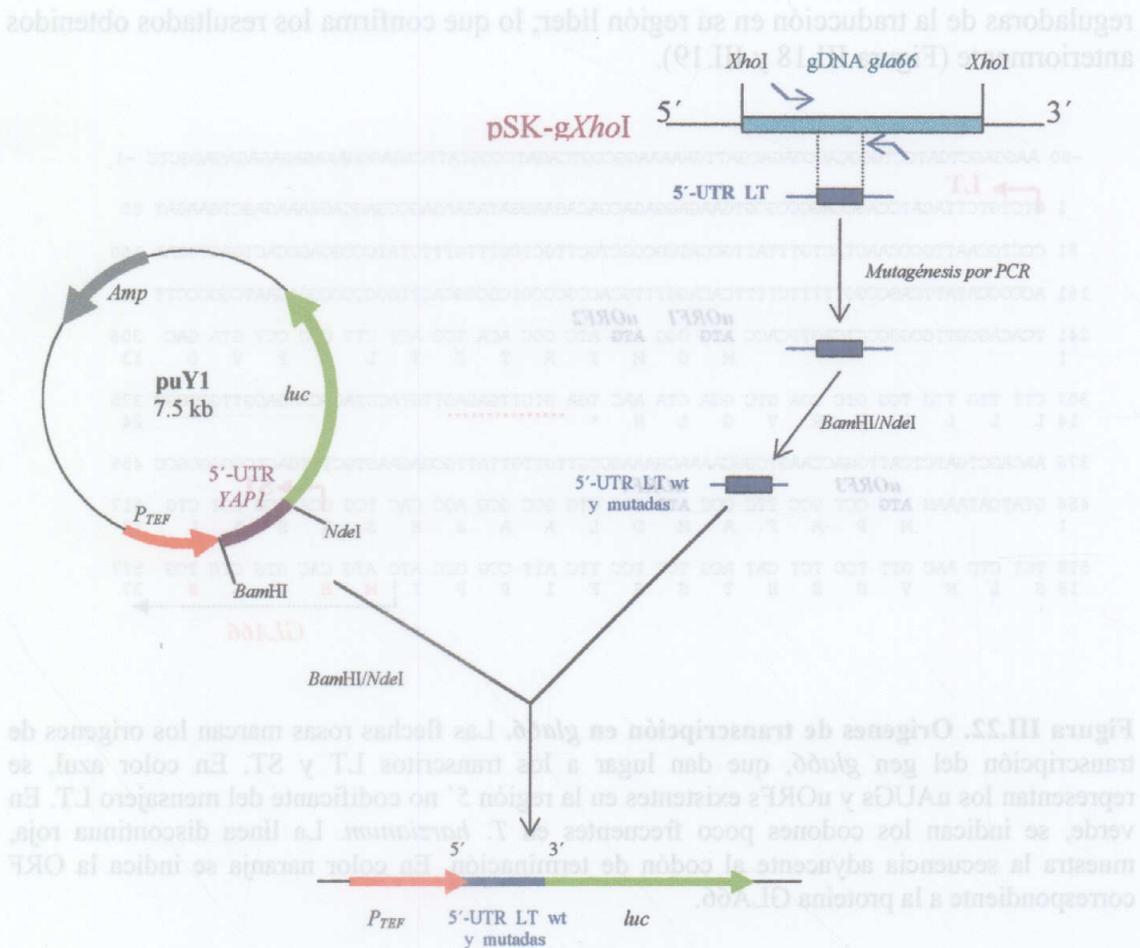


Figura III.23. Pasos seguidos en el subclonaje de las distintas versiones de la región líder del transcrito LT en el vector puY1. La abreviatura wt se refiere a la secuencia original del gen *gla66*.

De la región líder del transcrito LT, por tanto, se eliminaron gradualmente los codones uAUG y, por consiguiente, las uORFs. La Figura III.24 muestra el estudio cuantitativo realizado sobre el efecto posttranscripcional ejercido por las uORFs del transcrito LT.

Construcción	Secuencia
pwtUTR	5' ... <u>ATGGGGATGATCC</u> <u>ATGCCTGCCTTCGCCATGGACC</u> ...3'
pΔuORF1	5' ... <u>GCAGGGATGATCC</u> <u>ATGCCTGCCTTCGCCATGGACC</u> ...3'
pΔuORF2	5' ... <u>ATGGGGGCAATCC</u> <u>ATGCCTGCCTTCGCCATGGACC</u> ...3'
pΔuORF3	5' ... <u>ATGGGGATGATCC</u> <u>TTGCCTGCCTTCGCCATGGACC</u> ...3'
pΔuORF4	5' ... <u>ATGGGGATGATCC</u> <u>ATGCCTGCCTTCGCCTTGGACC</u> ...3'
pΔuORF(1+2)	5' ... <u>AAGGGGACGATCC</u> <u>ATGCCTGCCTTCGCCATGGACC</u> ...3'
pΔuORF(3+4)	5' ... <u>ATGGGGATGATCC</u> <u>ATACCTGCCTTCGCCATTGACC</u> ...3'
pΔuORF(1+2+3+4)	5' ... <u>AAGGGGACGATCC</u> <u>ATACCTGCCTTCGCCATTGACC</u> ...3'
puY1	Secuencia 5' no codificante del gen <i>YAP1</i> de <i>S. cerevisiae</i>

Tabla III.6. Construcciones realizadas con la región 5'-UTR del transcrito LT de *gla66*

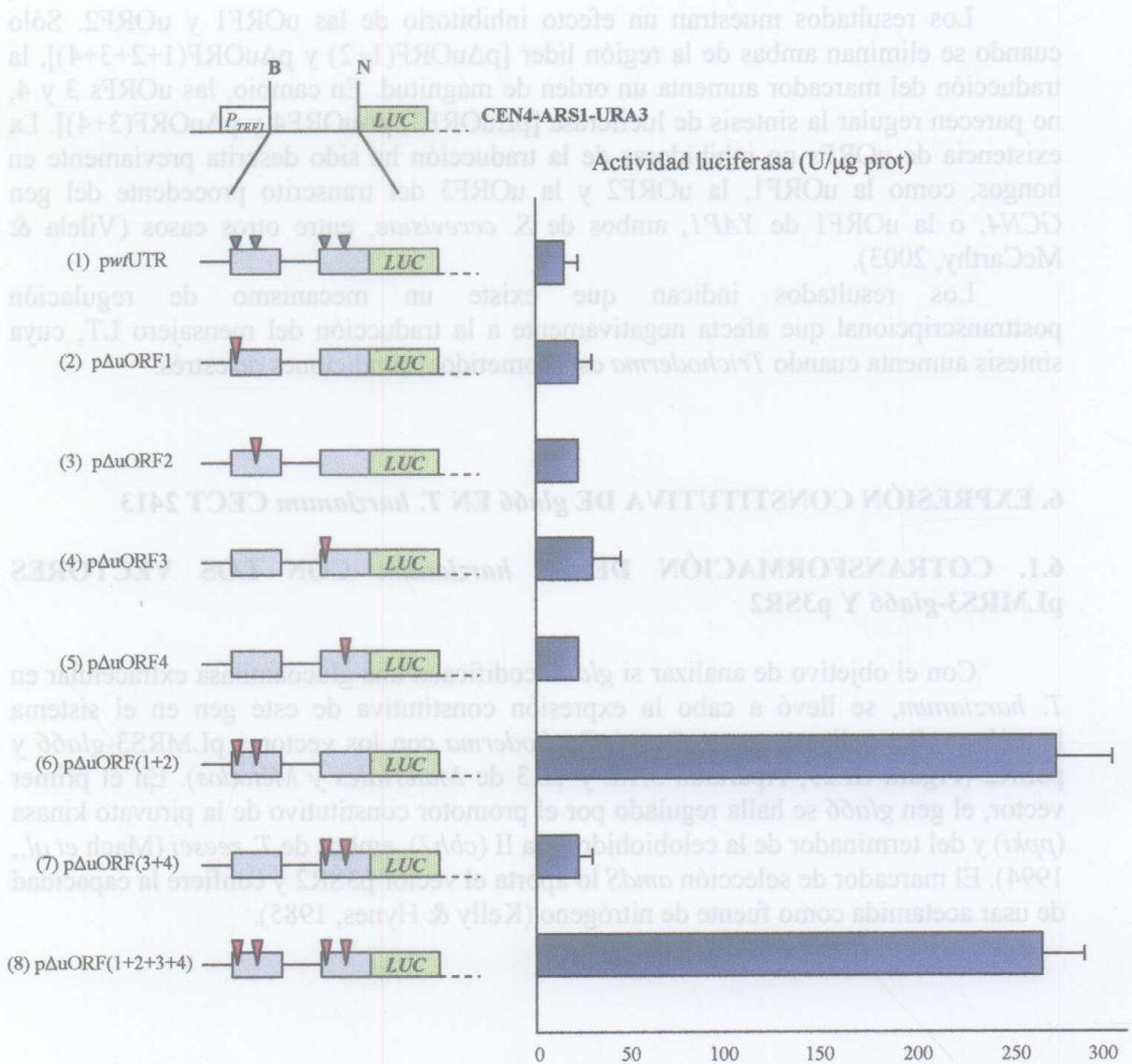


Figura III.24. Análisis cuantitativo del efecto generado por las uORFs del transcrito LT. En la figura se muestra la actividad luciferasa producida por las distintas construcciones, en las que se ha modificado la región líder del transcrito LT. Los triángulos verdes indican las uORFs putativas existentes en la región 5' no codificante; los de color rojo, las mutaciones realizadas sobre ésta. El análisis northern muestra los niveles de mRNA correspondientes al gen marcador en cada uno de los casos.

Los resultados muestran un efecto inhibitorio de las uORF1 y uORF2. Sólo cuando se eliminan ambas de la región líder [pΔuORF(1+2) y pΔuORF(1+2+3+4)], la traducción del marcador aumenta un orden de magnitud. En cambio, las uORFs 3 y 4, no parecen regular la síntesis de luciferasa [pΔuORF3, pΔuORF4 y pΔuORF(3+4)]. La existencia de uORFs no inhibitorias de la traducción ha sido descrita previamente en hongos, como la uORF1, la uORF2 y la uORF3 del transcrito procedente del gen *GCN4*, o la uORF1 de *YAP1*, ambos de *S. cerevisiae*, entre otros casos (Vilela & McCarthy, 2003).

Los resultados indican que existe un mecanismo de regulación posttranscripcional que afecta negativamente a la traducción del mensajero LT, cuya síntesis aumenta cuando *Trichoderma* está sometido a condiciones de estrés.

6. EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE *gla66* EN *T. harzianum* CECT 2413

6.1. COTRANSFORMACIÓN DE *T. harzianum* CON LOS VECTORES pLMRS3-*gla66* Y p3SR2

Con el objetivo de analizar si *gla66* codificaba una glucoamilasa extracelular en *T. harzianum*, se llevó a cabo la expresión constitutiva de este gen en el sistema homólogo. Para ello se cotransformó *Trichoderma* con los vectores pLMRS3-*gla66* y p3SR2 (Figura III.25; Apartado 3.1.2 y 12.3 de *Materiales y Métodos*). En el primer vector, el gen *gla66* se halla regulado por el promotor constitutivo de la piruvato quinasa (*ppki*) y del terminador de la celobiohidrolasa II (*cbh2*), ambos de *T. reesei* (Mach *et al.*, 1994). El marcador de selección *amdS* lo aporta el vector p3SR2 y confiere la capacidad de usar acetamida como fuente de nitrógeno (Kelly & Hynes, 1985).

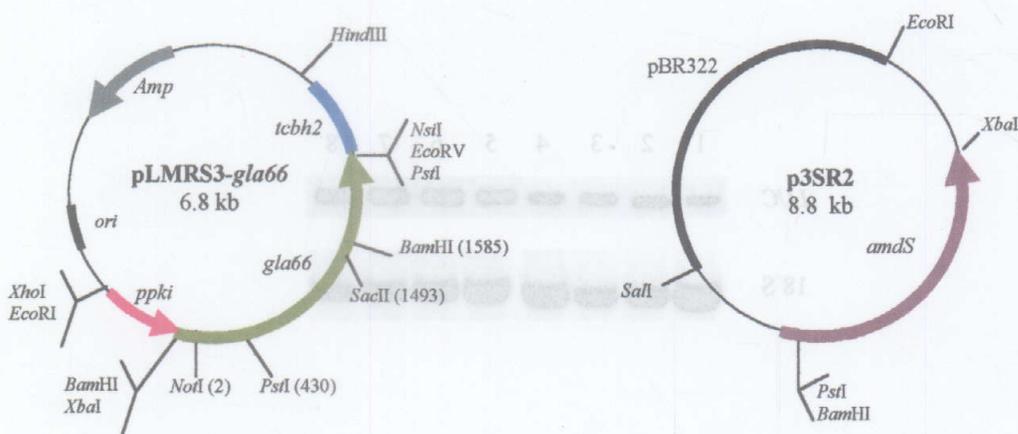


Figura III.25. Vectores utilizados en la cotransformación de *T. harzianum*, para la expresión constitutiva de *gla66*

6.2. ANÁLISIS DE LOS TRANSFORMANTES

El protocolo de cotransformación seguido se basó en el descrito por Pentillä *et al.* (1987). La frecuencia de transformación obtenida estuvo en torno a los 100 transformantes/ μg de DNA. A partir de las colonias crecidas en acetamida, se seleccionaron diez para someterlas al proceso de estabilización (Figura I.7). De los transformantes estables, se escogieron las cepas G9, G10 y G12, para su posterior análisis.

El patrón de integración y el número de copias insertadas en el genomio se determinó mediante análisis Southern. En el primero de los casos, el DNA genómico de las cepas se digirió con la enzima de restricción *Xba*I, lo que permitió linearizar el vector hallado en el genoma (Figura III.26). El sitio de integración se asemeja en los tres transformantes, lo que sugiere la presencia de puntos calientes de recombinación. Las bandas de mayor intensidad, existentes en los tres casos, reflejan las copias que se han dispuesto en tandem en el genoma.

Las copias se determinaron tras digerir con la enzima *Eco*RI, que liberaba el gen *gla66* del vector pLMRS3-*gla66*, relativizando con respecto a la copia endógena del gen en la cepa silvestre. El número de copias oscila entre 5 en los transformantes G9 y G10; y 4 en la cepa G12.

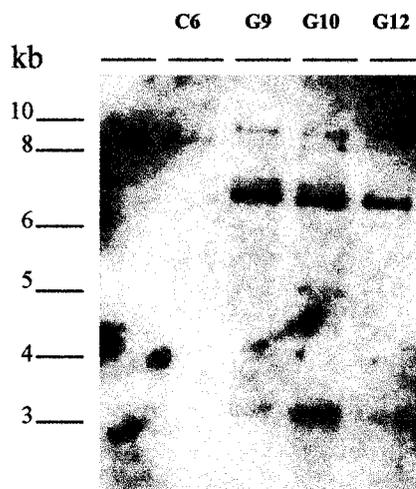


Figura III.26. Análisis Southern de los transformantes estables portadores de los vectores pLMRS3-*gla66* y p3SR2

Mediante un análisis northern se comprobó la expresión del gen *gla66*; a partir del RNA extraído de las cepas crecidas en MM con glucosa al 2% como fuente de carbono (Figura III.27). La expresión constitutiva de *gla66* en los transformantes no presenta una relación directa con respecto al número de copias del gen en la cepa, indicando la importancia de las secuencias colindantes del sitio de integración.

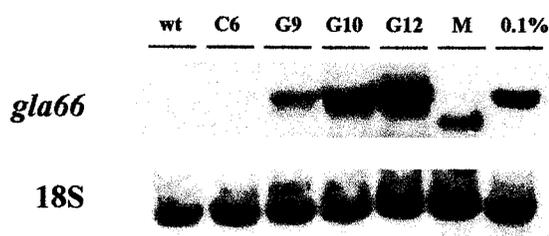


Figura III.27. Análisis northern de las cepas transformantes portadoras de la construcción pLMRS3-*glab66*

Mediante un análisis western, a partir de los sobrenadantes extraídos de las mismas condiciones de cultivo, se comprobó que la proteína se procesaba y se exportaba correctamente en los transformantes estables (Figura III.28). Los niveles de proteína extracelular se correlacionaban, en este caso, con los de RNA mensajero de las cepas transgénicas.

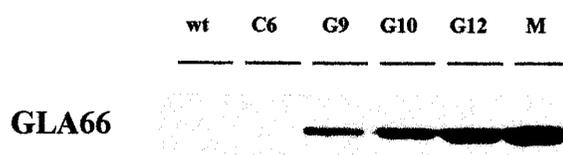


Figura III.28. Análisis western de las cepas transformantes portadoras de la construcción pLMRS3-*glab66*. En la inmunodetección realizada sobre los sobrenadantes, se utilizó el anticuerpo Ab1926 con factor de dilución 1:5000.

El análisis de los sobrenadantes (Tabla III.7), muestra actividad glucoamilasa a partir de la proteína codificada por *glab66*.

Actividad glucoamilasa (U/ml)	
<i>2% glucosa</i>	
CECT 2413	0.5 ± 0.1
C6	0.4 ± 0.1
G9	32.2 ± 1.8
G10	40.2 ± 3.2
G12	61.2 ± 4.9
<i>2% maltosa</i>	
CECT 2413	76.4 ± 3.0

Tabla III.7. Actividad glucoamilasa de las cepas transformantes para *glab66*

Los niveles de mRNA de *gla66* presentes en la cepa silvestre son inferiores a los hallados en los transformantes; mientras que la actividad es, por el contrario, superior. Esto probablemente se debe a que la exportación de proteínas no se halla favorecida en el microorganismo cuando crece en un medio rico en glucosa (Palamarczyk *et al.*, 1998).

Discusión III

En el presente capítulo, se caracteriza el gen *gla66* de *T. harzianum* CECT 2413, el cual codifica una glucoamilasa extracelular de 66 kDa, denominada GLA66. La confirmación de la actividad enzimática específica, se realiza mediante la expresión constitutiva de este gen en el sistema homólogo (Apartado 6 de *Resultados III*).

La secuencia de esta proteína presenta homología fundamentalmente con las glucoamilasas fúngicas; debido a la elevada conservación de los dominios existentes en la enzima y, en particular, de los aminoácidos implicados en el centro catalítico y en el dominio de unión al sustrato. La enzima de *T. harzianum* presenta características comunes a las glucoamilasas más evolucionadas, ya que posee dos dominios diferenciados, unidos por una región bisagra; es una proteína extracelular; y presenta los sitios propios de glicosilación, que contribuyen a estabilizar la enzima (Coutinho & Reilly, 1997). Por otro lado, GLA66 posee homología con numerosas amilasas y ciclodextrin glucoanotransferasas (CGTasas). En este caso, la similitud se centra principalmente en la región carboxilo terminal, donde se localiza el dominio de unión al almidón, común en estas enzimas. No obstante, la estructura secundaria y terciaria de la región catalítica de las amilasas es relativamente parecida a la de las glucoamilasas, siendo de $(\alpha/\beta)_8$ y $(\alpha/\alpha)_6$, respectivamente.

El dominio catalítico de GLA66 contiene la secuencia DLWEEV, extremadamente conservada en las glucoamilasas. Este dominio contiene los residuos de glutámico, que actúan teóricamente como ácido y base catalíticos en el proceso de hidrólisis, a la distancia óptima según el modelo tridimensional de la enzima (Figura III.13; Figura III.15.B) [Radford *et al.*, 1986].

En cuanto a la regulación del gen *gla66*, está sometido a represión por glucosa y a inducción por maltosa, como se ha descrito previamente en otras glucoamilasas (Gomi *et al.*, 2000; Radford *et al.*, 1986). El glicerol, en este caso, actúa como fuente de carbono neutra, hecho que ocurre con otros genes de *Trichoderma* (Henrique-Silva *et al.*, 1996; Ilmén *et al.*, 1997).

A partir del gen *gla66* se originan dos mRNAs, con diferentes orígenes de transcripción, según las condiciones de crecimiento en las que se encuentre el micelio. El transcrito ST, de 2.1 kb, origina la proteína GLA66. El transcrito LT, de 2.6 kb, presenta una región 5' no codificante o UTR de extensión inusual. Esta región líder consta de cuatro uORFs: la 1 y la 2 codifican péptidos putativos de 23 y 21 residuos respectivamente; y la 3 y la 4 solapan en fase con la ORF de GLA66.

El modelo de traducción descrito en eucariotas, predice que los elementos reguladores hallados en la región 5'-UTR de un transcrito, pueden influir sobre la accesibilidad del ribosoma a la ORF situada aguas abajo (Gaba *et al.*, 2001; Morris & Geballe, 2000; revisado en Kozak, 1999). Entre estos elementos en *cis*, que pueden regular la traducción del mensajero, se encuentran los codones AUGs (uAUGs) y, en algunos casos, las ORFs asociadas o uORFs. Con frecuencia, se ha demostrado que la presencia de estos elementos en la secuencia líder de los mensajeros influye negativamente en su traducción (Vilela *et al.*, 1998; Oliveira & McCarthy, 1995; revisado en Vilela & McCarthy, 2003). Los mRNAs eucarióticos, considerados como monocistrónicos, pueden por tanto presentar una estructura compleja semejante a un policistrón.

La existencia de mensajeros regulados por uORFs en diversos sistemas biológicos, como hongos, virus y células de mamíferos, sugiere que esta estrategia reguladora se halla ampliamente distribuida en la naturaleza. Los casos mejor estudiados en hongos se refieren a los transcritos cuyos productos están implicados en la biosíntesis de aminoácidos, como los genes *GCN4* y *CPA1* de *S. cerevisiae*, *cpcA* en *A.*

nidulans y *arg-2* de *N. crassa* (Hinnebush, 1997; Hoffman *et al.*, 2001; revisado en McCarthy, 1998; revisado en Sachs, 1998).

El transcrito LT se sintetiza fundamentalmente en situaciones limitantes de crecimiento; así como bajo la acción de determinados agentes o condiciones estresantes, como déficit de nitrógeno, metales pesados y bajas temperaturas. Trabajos recientes refieren la síntesis de dos transcritos a partir del mismo gen *SUA7*, que codifica el factor de transcripción TFIIB de *S. cerevisiae*, según las condiciones de crecimiento a las que se somete la levadura. El estrés y las condiciones desfavorables de crecimiento conducen a un descenso en la cantidad relativa del transcrito de mayor tamaño (Hoopes *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha descrito la transcripción desde varios puntos en el gen *SGA* de *S. cerevisiae* (Pardo *et al.*, 1986), que codifica la glucoamilasa intracelular específica de esporulación, que presenta homología con GLA66.

La existencia en un transcrito de varios codones de iniciación en fase, puede generar proteínas que difieran en su extremo amino terminal (Geballe, 1996). Este es el caso del gen *STA2* de *S. cerevisiae*, que genera glucoamilasas que se diferencian en la región amino terminal, lo que determina la localización de la proteína (Vivier *et al.*, 1999). Por ello, se analizó si el transcrito LT generaba una enzima de peso molecular superior al de GLA66; o bien si generaba un precursor cuya proteólisis produciría proteínas de menor peso molecular, como se describió previamente en el caso de las glucoamilasas G1 y G2 de *A. niger*, obtenidas a partir de la hidrólisis de una proteína precursora (Svensson *et al.*, 1986).

El análisis de la secuencia de la proteína putativa codificada por el transcrito LT, mediante el programa PESTfind (<http://vienna.at.embnet.org/htbin/embnet/PESTfind>), mostró una región susceptible de proteólisis: ₂₀₅RVDTLTPSPPTKE₃₀₇, situada en el dominio catalítico. Este dominio se halla glicosilado, lo que le protege y le hace relativamente resistente a la acción de las proteasas. En cambio, la región bisagra, suele ser la más susceptible a hidrólisis (Radford *et al.*, 1996; Boel *et al.*, 1984b; Svensson *et al.*, 1986). Estos hechos sugieren que la proteína putativa codificada por el transcrito LT no constituye un precursor proteico.

No se detectó glucoamilasa alguna en las condiciones donde se producía únicamente el transcrito LT; lo cual confirmaba la ausencia de actividad en los extractos (Figura III.18 y Figura III.19). La falta de enzima junto con la existencia de uORFs en la región líder del mensajero LT, apuntaban a que este mensajero no era traducido. Esta hipótesis se comprobó mediante un sistema heterólogo puesto a punto previamente en levaduras (Vilela *et al.*, 1998). Los resultados mostraban que la región 5' no codificante del transcrito LT regulaba negativamente la traducción del gen marcador. La desaparición de los codones de iniciación de las uORFs 1 y 2, aumentaba la traducción en un orden de magnitud (Figura III.24). Ambas presentan las características propias de las uORFs que se consideran inhibitoras, lo que apoya los resultados obtenidos. Cabe destacar, que no existe un consenso respecto a la secuencia de los péptidos codificados por las uORFs, descritas en la literatura. No obstante, poseen la característica común de perturbar la secuencia de eventos que ocurre durante la traducción, lo que puede dificultar el paso hacia la ORF que se sitúe aguas abajo (Geballe, 1996; Grundmann *et al.*, 2001; Kozak, 1999; Vilela & McCarthy, 2003).

Por un lado, las uORF1 y 2, presentan un contenido rico en G/C inmediatamente después del codón de terminación; hecho descrito anteriormente en la uORF1 del gen *YAP2* y en la uORF4 del gen *GCN4* de *S. cerevisiae* (Vilela *et al.*, 1998). Por otro, presentan una longitud que puede reducir la eficiencia de reiniciación. Estudios previos muestran que el mRNA apenas se traduce cuando la uORF contiene 30 codones (Luukkonen *et al.*, 1995). Por último, contienen codones de parada o poco frecuentes en

la especie (Goldman *et al.*, 1998), lo que puede ralentizar el paso de la maquinaria traduccional y ocasionar un bloqueo ribosómico en ésta (Komar *et al.*, 1999).

El análisis de la secuencia de la región reguladora de *glab66*, muestra una secuencia próxima al consenso de la caja TATA en la posición -42 con respecto al origen de transcripción del mensajero ST. En cambio, no existe caja TATA ni similar, en relación al inicio de la transcripción del mensajero LT. La presencia o ausencia de este elemento puede influir en la interacción de los factores generales de transcripción y de la RNA polimerasa con el promotor, y puede contribuir a establecer diferencias en la regulación del gen (revisado por Smale, 1997). Trabajos previos describen la transcripción diferencial del gen *SUA7* de *S. cerevisiae*, según las condiciones de cultivo, a partir de la zona del promotor que contiene la caja TATA o bien a partir de la zona en la que esta caja está ausente (Hoopes *et al.*, 2000).

Se podrían plantear distintas hipótesis según los resultados obtenidos. Por un lado, las condiciones desfavorables para el crecimiento del microorganismo, podrían desembocar en una situación estresante en la que se pasaran por alto los controles de regulación transcripcional, acumulándose RNA mensajeros innecesarios en procesos como el de esporulación. *T. harzianum* tiende a esporular cuando el micelio se somete a condiciones limitantes de crecimiento. Un evento parecido se ha descrito en el caso de *A. nidulans*, donde se ha comprobado la acumulación de mensajeros denominados “*inapropiados*”, por no corresponder su expresión a las condiciones en las que se halla el micelio (Prade *et al.*, 2001). Un aspecto interesante en relación a este tipo de transcritos, es que la mayoría están relacionados con funciones de degradación de proteínas o de paredes celulares vegetales, sustratos muy abundantes en los hábitats naturales donde se encuentran las especies del género *Aspergillus*.

El mensajero LT podría considerarse como un transcrito “*inapropiado*”, donde la región 5'-UTR constituiría el mecanismo para impedir la traducción de una proteína, que no es necesaria en ese momento. Por tanto, una situación desfavorable o estresante para el microorganismo podría desembocar en la transcripción del gen desde otro inicio de transcripción, conteniendo el transcrito las señales necesarias para evitar la síntesis de la proteína correspondiente. Esta regulación de la traducción ahorraría energía, que podría utilizarse en otras funciones prioritarias previas a la esporulación.

Hay que subrayar que la transcripción, desde el punto de vista energético, es un proceso caro para la célula. Por tanto, la síntesis del mensajero LT podría no ser un evento accidental, constituyendo una consecuencia programada. Parte de las uORFs existentes en la región 5' no codificante del transcrito LT, contribuyen a inhibir la traducción del mensajero (Figura III.24). Ya que la síntesis de proteína es uno de los procesos que más energía consume en la célula, su inhibición, mediante la existencia de uORFs, favorecería el mantenimiento de los niveles de ATP celulares. La regulación de la traducción preservaría la energía hasta que otras fuentes de carbono alternativas estuvieran disponibles. En trabajos previos, se ha propuesto que la interrupción de la traducción, asociada a la falta de nutrientes en el medio, podría estar implicada en la reactivación eficiente de la expresión génica (Ashe *et al.*, 2000). Este hecho ha sido descrito en *S. cerevisiae*, donde se ha considerado un efecto indirecto, en el que la ausencia de síntesis proteica permite la acumulación de transcritos y proteínas, que pueden contribuir a que exista una reprogramación de la expresión génica eficiente (Wiatrowski & Carlson, 2003; Ashe *et al.*, 2000). Estudios recientes sugieren un papel preventivo o implicado en protección, del número significativo de transcritos que se acumulan en *A. nidulans*, en respuesta a estrés (Prade *et al.*, 2001).

T. harzianum, del mismo modo, podría pasar por alto los mecanismos reguladores y podría acumular transcritos, que confirieran ventajas de protección y

adaptación a la espora. Teniendo en cuenta este hecho, el transcrito LT podría depositarse en la célula y ser útil durante el proceso de germinación. El problema que plantea esta hipótesis, es que si fuera necesaria una traducción eficiente, las uORFs 1 y 2 del transcrito LT deberían eliminarse de la región líder, ya que la existencia de uno o más codones de iniciación aguas arriba de la ORF principal del mensajero inhibe la traducción, la cual depende de la estructura de caperuza o *cap* de guanina (Kozak, 1999). Una alternativa, sería la existencia de lugares internos de inicio de la traducción (IRES); aunque este tipo de fenómeno no ha sido claramente demostrado en hongos (McCarthy, 1998; Kozak, 2001a). No obstante, se ha mencionado este tipo de proceso traduccional en células de *S. cerevisiae* sometidas a estrés nutricional, aunque son necesarias investigaciones adicionales que confirmen este hecho (Paz *et al.*, 1999). Recientemente, se han identificado secuencias que funcionan como IRES en la región líder de los genes *YAP1* y *p150*, que codifican un factor de traducción implicado en resistencia a estrés y un factor de inicio de la traducción en *S. cerevisiae* (Zhou *et al.*, 2001). La traducción mediante IRES es un proceso independiente de *cap* de guanina. Necesita de estructuras secundarias, de determinados factores proteicos, así como de secuencias complementarias al rRNA 18S (Kozak, 2001). Este tipo de proceso traduccional se activa bajo condiciones de estrés, donde la traducción dependiente de *cap* se halla bloqueada y la iniciación depende de las IRES (Meijer & Thomas, 2002).

Numerosos trabajos refieren el papel de las uORFs en los mecanismos de control posttranscripcional, en la inhibición o en la reducción basal de los niveles proteicos en levaduras y otros hongos (Geballe, 1996; Kozak, 1999; Sachs, 1998; Vilela & McCarthy, 2003). El presente estudio, refleja dos eventos de transcripción a partir de un mismo gen, dependientes de las condiciones de crecimiento; a los cuales se asocia una regulación posttranscripcional mediada por uORFs. Será necesario un estudio profundo, para conocer el sentido biológico del transcrito LT de *T. harzianum*.

Conclusiones

1. El gen *chit33* de *T. harzianum* CECT 2413 está regulado positivamente por los sustratos sobre los que actúa la quitinasa.
2. La falta de fuente de carbono y/o de nitrógeno, la presencia de polímeros de difícil asimilación como la quitina y los choques térmicos, inducen la expresión del gen *chit33*.
3. La inducción del gen *chit33* es dependiente del contacto con los patógenos ensayados, *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*.
4. Las plantas transgénicas psCHIT33 expresan la quitinasa CHIT33 de *T. harzianum* de forma activa.
5. Las plantas transgénicas psCHIT42, psCHIT33 y psCHIT33x42, portadoras de las quitinasas CHIT42, CHIT33 y de ambas respectivamente, presentan mayor resistencia que las plantas silvestres a los fitopatógenos *R. solani* y *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, así como a estrés producido por sal y por metales pesados.
6. El efecto sinérgico producido por las quitinasas CHIT33 y CHIT42 *in vitro*, no se reproduce en las plantas de tabaco que coexpresan ambas quitinasas.
7. El gen *glab6* de *T. harzianum* CECT 2413 presenta dos orígenes de transcripción separados por 508 pb, generando dos transcritos de 2.16 kb (ST) y de 2.6 kb (LT), respectivamente.
8. El transcrito ST codifica una glucoamilasa extracelular, GLA66, que presenta dominios conservados en otras enzimas amilolíticas.
9. La expresión de *glab6* se reprime por catabolito de carbono; se induce por sustrato, generando el transcrito ST, y se desreprime en condiciones de estrés nutricional, generando mayoritariamente el transcrito LT.
10. Existe un mecanismo de regulación posttranscripcional, mediado por uORF, que afecta negativamente a la traducción del mensajero LT.

Bibliografía

- Agosin, E. & Aguilera, J. M. (1998). Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 205-227. Taylor & Francis Ltd. London.
- Agrios, G.N. (1988). *Plant pathology*. Academic Press. Londres.
- Ahmad, J.S. & Baker, R. (1987). Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **77**, 358-362.
- Alamillo, J. M. & García-Olmedo, F. (2001). Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant J* **25**, 529-540.
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. & et al. (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7327-7331.
- Alonso, E., de Carvalho Niebel, F., Obregón, P., Gheysen, G., Inzé, D., Van Montagu & Castresana C. (1995). Differential *in vitro* DNA binding activity to a promoter element of the *gnl* β -1, 3-glucanase gene in hypersensitively reacting tobacco plants. *Plant J* **7**, 309-320.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Bjökman, T. & 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.
- Amaya, I., Botella, M. A., de la Calle, M., Medina, M. I., Heredia, A., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., Quesada, M. A. & Valpuesta, V. (1999). Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett* **457**, 80-84.
- Apse, M. P. & Blumwald, E. (2002). Engineering salt tolerance in plants. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 146-150.
- Arduini, I., Godbold, D.L., Onnis, A. (1996). Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Tree Physiology* **15**, 411-415.
- Arst, H. N., Jr. & Cove, D. J. (1973). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **126**, 111-141.
- Ashe, M. P., De Long, S. K. & Sachs, A. B. (2000). Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol Biol Cell* **11**, 833-848.
- Avni, A., Bailey, B. A., Mattoo, A. K. & Anderson, J. D. (1994). Induction of ethylene biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by a *Trichoderma viride* xylanase is correlated to the accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase transcripts. *Plant Physiol* **106**, 1049-1055.
- Baek, J. M., Howell, C. R. & Kenerley, C. M. (1999). The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* **35**, 41-50.
- Bailey, B.A. & Lumsden, R. D. (1998). Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 185-204. Taylor & Francis Ltd. London.
- Bailey, B.A., Korcak, R.F. & Anderson, J.D. (1992). Alterations in *Nicotiana tabacum* L. cv Xhanti cell membrane function following treatment with an ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase. *Plant Physiol* **100**, 749-755.

- Baulcombe, D.C. (1996).** Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833-1844.
- Benítez, T., Limón C., Delgado-Jarana, J. & Rey, M. (1998).** Glucanolytic and other enzymes and their genes. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 101-121. Taylor & Francis Ltd. London.
- Betina, V. & Farkas, V. (1998).** Sporulation and light induced development in *Trichoderma*. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Kubicek & Harman (Eds.). 75-90. Taylor & Francis Ltd. London.
- Bhella, R. S. & Altosaar, I. (1987).** Production of multiple forms of glucoamylase in *Aspergillus awamori*. *Biochem Cell Biol* **65**, 762-765.
- Bi, Y. M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R. & Draper, J. (1995).** Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J* **8**, 235-245.
- Boel, E., Hansen, M. T., Hjort, I., Hoegh, I. & Fiil, N. P. (1984b).** Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *Embo J* **3**, 1581-1585.
- Boel, E., Hjort, I., Svensson, B., Norris, F., Norris, K. E. & Fiil, N. P. (1984a).** Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *Embo J* **3**, 1097-1102.
- Bolar, J. P., Norelli, J. L., Harman, G. E., Brown, S. K. & Aldwinckle, H. S. (2001).** Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res* **10**, 533-543.
- Boller, T. (1989).** Primary signals and secondary messengers in the reaction of plants to pathogens. En: *Second messengers in plant growth and development*. W.F. Boss & D.J. Morré (eds.) 227-255. Alan Liss, New York.
- Boller, TaMF. (1988).** Colorimetric assay for chitinase. *Methods in Enzymology*. **161**, 430-435.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C. & Minibayeva, F. (2002).** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* **53**, 1367-1376.
- Bonas, U. & Lahaye, T. (2002).** Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol* **5**, 44-50.
- Botella, M. A., Quesada, M. A., Kononowicz, A. K., Bressan, R. A., Pliego, F., Hasegawa, P. M. & Valpuesta, V. (1994b).** Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant Mol Biol* **25**, 105-114.
- Botella, M. A., Quesada, M. A., Medina, M. I., Pliego, F. & Valpuesta, V. (1994a).** Induction of a tomato peroxidase gene in vascular tissue. *FEBS Lett* **347**, 195-198.
- 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.
- Briat, J. F. & Lebrun, M. (1999).** Plant responses to metal toxicity. *C R Acad Sci III* **322**, 43-54.
- Buchel, A. S., Brederode, F. T., Bol, J. F. & Linthorst, H. J. (1999).** Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression *in vivo*. *Plant Mol Biol* **40**, 387-396.
- Büchter, R., Stromberg, A., Schmelzer, E. & Kombrink, E. (1997).** Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Mol Biol* **35**, 749-761.

- Busam, G., Kassemeyer, H. H. & Matern, U. (1997). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol* **115**, 1029-1038.
- Carmona, M. J., Molina, A., Fernández, J.A., López-Fando, J.J. & García-Olmedo, F. (1993). Expression of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J* **3**: 457-462.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutiérrez, A., Chet, I. & Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol* **65**, 929-935.
- Carsolio, C., Gutiérrez, A., Jiménez, B., Van Montagu, M. & Herrera-Estrella, A. (1994). Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10903-10907.
- Cataldo, D.A., McFadden, K.M., Garland, T.R. & Wildung, R.E. (1988). Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II) and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiol* **86**, 734-739.
- Cepeda, C., Dana, M. M., García, I., Cubero, B., Pintor-Toro, J. A. (2000). Increased hypersensitive response of transgenic tobacco plants expressing chitinases from *Trichoderma harzianum*. 6th IOBC/EFPP Biocontrol Workshop. Sevilla, España.
- Chamngpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr., Van Montagu, M., Inze, D. & Van Camp, W. (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5818-5823.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J. & Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol* **27**, 302-313.
- Chen, D. C., Yang, B. C. & Kuo, T. T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* **21**, 83-84.
- Chen, T. H. & Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 250-257.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma*. Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En: *Innovative Approaches to Plant Disease Control. I.* Chet (Ed.) 137-160. Wiley and Sons. New York.
- Chet, I. (1990). Mycoparasitism: recognition, physiology and ecology. En: *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases.* 725-733. R. Baker y P.E. Dum (Eds.). Alan R. Liss, Inc. New York.
- Chet, I., Benhamou, N. & Haran, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. En: *Trichoderma and Gliocladium.* Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 153-172. Taylor & Francis Ltd. London.
- Clarke, H.R., Davis, J.M., Wilbert, S.M., Bradshaw, H.D. Jr. & Gordon, M.P. (1994). Wound-induced and developmental activation of a poplar tree chitinase gene promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **25**, 799-815.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. & Vad, K. (1993). Plant chitinases. *Plant J* **3**, 31-40.
- Cortés, C., Gutiérrez, A., Olmedo, V., Inbar, J., Chet, I. & 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.

- Coutinho, P. M. & Reilly, P. J. (1997). Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships. *Proteins* **29**, 334-347.
- Cubero, B. & Scazzocchio, C. (1994). Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **13**, 407-415.
- Dana, M. M. & Pintor-Toro, J. A. (2002). La sobreexpresión de genes de quitinasas de *Trichoderma harzianum* en tabaco, mejora la resistencia de las plantas frente a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y *Rhizoctonia solani*. Congreso Nacional de Biotecnología. Sevilla, España.
- Dana, M. M., Limón, M. C., Mejías, R., Mach, R. L., Benítez, T., Pintor-Toro, J. A. & Kubicek, C. P. (2001). Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **38**, 335-342.
- Danielson, R.M. & Davey, C.D. (1973). Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biol Biochem* **5**, 505-515.
- Davies, K.J.A., Lin, S.W. & Pacifi, R.E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J Biol Chem* **262**, 9914-9920.
- De Azevedo, A. M., De Marco, J. L. & Felix, C. R. (2000). Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *FEMS Microbiol Lett* **188**, 171-175.
- De Boer, W., Verheggen, P., Gunnewiek P.J.K., Kowalchuk, G.A. & van Veen, J.A. (2003). Microbial community composition affects soil fungistasis. *Appl Environ Microbiol* **69**, 835-844.
- De la Cruz, B. J., Prieto, S. & Scheffler, I. E. (2002). The role of the 5' untranslated region (UTR) in glucose-dependent mRNA decay. *Yeast* **19**, 887-902.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benítez, T., Pintor-Toro, J. A. & Llobell, A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur J Biochem* **206**, 859-867.
- De la Cruz, J., Rey, M., Lora, J. M., Hidalgo-Gallego, A., Domínguez, F., Pintor-Toro, J. A., Llobell, A. & Benítez, T. (1993). Carbon source control on β -glucanases, chitobiase and chitinase from *T. harzianum*. *Arch Microbiol* **159**, 316-322.
- De la Fuente, J. M., Mosqueda-Cano, G., Álvarez-Morales, A. & Herrera-Estrella, L. (1992). Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco plants confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bio/Technology* **10**, 905-909.
- Deák, M., Horvath, G. V., Davletova, S., Torok, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Kiraly, Z. & Dudits, D. (1999). Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nat Biotechnol* **17**, 192-196.
- Del Pozo, O. & Lamb, E. (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology* **8**, 1129-1132.
- Delgado-Jarana, J. (2001). Producción de β -1,6-glucanasa II y genes regulados por pH en *Trichoderma harzianum*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Delgado-Jarana, J., Pintor-Toro, J. A. & Benítez, T. (2000). Overproduction of β -1, 6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. *Bioch Biophys Acta* **1481**: 289-296.
- Del-Río, G., Morett, E. & Soberon, J. (1997). Did cyclodextrin glycosyltransferases evolve from α -amylases?. *FEBS Lett* **416**, 221-224.

- Dennis & Webster (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interactions. *Trans Br Mycol Soc* **57**, 363-369.
- Di Pietro A., Lorito M., Hayes C.K., Broadway R.M. & Harman G.E. (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* **83**, 308-313.
- Draborg, H., Christgau, S., Halkier, T., Rasmussen, G., Dalboge, H. & Kauppinen, S. (1996). Secretion of an enzymatically active *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **29**, 404-409.
- Draborg, H., Kauppinen, S., Dalboge, H. & Christgau, S. (1995). Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two exochitinases from *Trichoderma harzianum*. *Biochem Molec Biol Int* **36**, 781-791.
- Droillard, M. J., Thibivilliers, S., Cazale, A. C., Barbier-Brygoo, H. & Lauriere, C. (2000). Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett* **474**, 217-222.
- Dubey, A. K., Suresh, C., Kavitha, R., Karanth, N. G. & Umesh-Kumar, S. (2000). Evidence that the glucoamylases and alpha-amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme. *FEBS Lett* **471**, 251-255.
- Dubos, B. (1987). Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. En: Innovative Approaches to plant disease control. I. Chet (Ed.). 107-135. Wiley, New York.
- Duffy, B., Schouten, A. & Raaijmakers, J. M. (2003). Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 501-538.
- Düring, K. (1993). Can lysozymes mediate antibacterial resistance in plants? *Plant Mol Biol* **23**, 209-214.
- Durner, J. & Klessig, D. F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11312-11316.
- Ebel, J. (1998). Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *BioEssays* **20**, 569-576.
- Eiznhamer, D. A., Ashburner, B. P., Jackson, J. C., Gardenour, K. R. & Lopes, J. M. (2001). Expression of the *INO2* regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by positive and negative promoter elements and an upstream open reading frame. *Mol Microbiol* **39**, 1395-1405.
- Elad Y., Barak R. & Chet I. (1984). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol Biochem* **16**, 381-386.
- Elad Y., Chet I. & Henis Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* **28**, 719-725.
- Elad Y., Chet I., Boyle P. & 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., Zimand, G., Zaqs, Y., Zuriel, S. & Chet, I. (1993). Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathol* **42**, 324-332.
- El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D. E. & El-Dorry, H. (1989). Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6138-6141.

- Ellis, C. & Turner, J. G. (2001). The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**, 1025-1033.
- Ellis, C., Karayyllidis, I., Wasternack, C. & Turner, J. G. (2002). The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**, 1557-1566.
- Esaka, M. & Teramoto, T. (1998). cDNA cloning, gene expression and secretion of chitinase in winged bean. *Plant Cell Physiol* **39**, 349-356.
- Fagerström, R. & Kalkkinen, N. (1995). Characterization, subsite mapping and partial amino acid sequence of glucoamylase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Appl Biochem* **21** (Pt 2), 223-231.
- Fagerström, R. (1994). Purification and specificity of recombinant *Hormoconis resinae* glucoamylase P and endogenous glucoamylase from *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb Technol* **16**, 36-42.
- Faik, A., Labouré, A.M., Gulino, D., Mandaron, P. & Falconet, D. (1998). A plant surface protein sharing structural properties with animal integrins. *Eur J Biochem* **153**, 552-559.
- Fang, P., Wang, Z. & Sachs, M. S. (2000). Evolutionarily conserved features of the arginine attenuator peptide provide the necessary requirements for its function in translational regulation. *J Biol Chem* **275**, 26710-26719.
- Fath, A., Bethke, P., Beligni, V. & Jones, R. (2002). Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J Exp Bot* **53**, 1273-1282.
- Flores, A., Chet, I. & Herrera-Estrella, A. (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr Genet* **31**, 30-37.
- Fogliano, V., Ballio, A., Gallo, M., Woo, S., Scala, F. & Lorito, M. (2002). *Pseudomonas* Lipopeptides and Fungal Cell Wall-Degrading Enzymes Act Synergistically in Biological Control. *MPMI* **15**, 323-333.
- Fry, S. C., Aldington, S., Hetherington, P. R. & Aitken, J. (1993). Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol* **103**, 1-5.
- Fu, Y. H. & Marzluf, G. A. (1990). *Nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5331-5335.
- Fuchs, Y., Saxena, A., Gamble, H.R. & Anderson, J.D. (1989). Ethylene biosynthesis-inducing protein from cellulysin is an endoxylanase. *Plant Physiol* **89**, 138-143.
- Fujii, M. & Kawamura, Y. (1985). Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch. *Biotechnol Bioeng* **27**, 260-265.
- Fujimori, F. & Okuda, T. (1994). Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. I. Fungi. *J Antibiot (Tokyo)* **47**, 173-182.
- Gaba, A., Wang, Z., Krishnamoorthy, T., Hinnebusch, A. G. & Sachs, M. S. (2001). Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *Embo J* **20**, 6453-6463.
- Galante., Y.M., de Conti, A. & Monteverdi, R. (1998). Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 311-341. Taylor & Francis Ltd. London.
- Gams, W. & Meyer, W. (1998). What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai? *Mycologia* **90**, 904-915.

- García, I. (1997).** Caracterización del gen de la quitinasa CHIT42 del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* y análisis de su expresión en plantas de tabaco. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- García, I., Lora, J. M., de la Cruz, J., Benítez, T., Llobell, A. & Pintor-Toro, J. A. (1994).** Cloning and characterization of a chitinase (*chit42*) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **27**, 83-89.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M. & Rodríguez-Palenzuela, P. (1998).** Plant Defense Peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* **47**, 479-491.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M. & Poza-Carrión, C. (2001).** Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyntirite in plant defence. *FEBS Lett* **498**, 219-222.
- Garg, A. K., Kim, J. K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Choi, Y. D., Kochian, L. V. & Wu, R. J. (2002).** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15898-15903.
- Gari, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Fitcher, B. & Aldea, M. (2001).** Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev* **15**, 2803-2808.
- Geballe, A. P. (1996).** Translational Control Mediated by Upstream AUG Codons. En: *Translational Control*. John W.B. Hershey, M.B. Mathews & Nanhum Sonenberg (Eds.). 173-197. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Geisen, R. (1995).** Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Penicillium nalgiovense*. *World J Microbiol Biotechnol* **11**, 322-325.
- Geremia R.A., Goldman G.H., Jacobs D., Ardiles W., Vila S.B., van Montagu M. & Herrera-Estrella A. (1993).** Molecular characterization of a proteinase-encoding gene, *pbr1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol Microbiol* **8**, 603-613.
- Giardina, T., Gunning, A. P., Juge, N., Faulds, C. B., Furniss, C. S., Svensson, B., Morris, V. J. & Williamson, G. (2001).** Both binding sites of the starch-binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase are essential for inducing a conformational change in amylose. *J Mol Biol* **313**, 1149-1159.
- Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarín, C., López-Coronado, M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R. & Moreno, V. (2000).** The yeast *HAL1* Gene Improves Salt Tolerance of Transgenic Tomato. *Plant Physiology* **123**, 393-402.
- Godoy, J. A., Luna, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R. M. & Pintor-Toro, J. A. (1994).** Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol* **26**, 1921-1934.
- Goldman, G.H., Pellizon, C.H., Marins, M., McInerney & Goldman, M.S.H. (1998).** *Trichoderma* spp. genome and gene structure. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Kubicek & Harman (Eds.). 209-221. Taylor & Francis Ltd. London.
- Goller, S. P., Gorfer, M. & Kubicek, C. P. (1998a).** *Trichoderma reesei* prs12 encodes a stress- and unfolded-protein-response-inducible regulatory subunit of the fungal 26S proteasome. *Curr Genet* **33**, 284-290.
- Goller, S. P., Schoisswohl, D., Baron, M., Parriche, M. & Kubicek, C. P. (1998b).** Role of endoproteolytic dibasic proprotein processing in maturation of secretory proteins in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3202-3208.
- Gómez, I., Chet, I. & Herrera-Estrella, A. (1997).** Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Mol Gen Genet* **256**, 127-135.

- Gomi, K., Akeno, T., Minetoki, T., Ozeki, K., Kumagai, C., Okazaki, N. & Iimura, Y. (2000). Molecular cloning and characterization of a transcriptional activator gene, *amyR*, involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 816-827.
- Gooday, G.W. (1990). The ecology of chitin degradation. *Adv Microb Ecol* **11**, 387-430.
- Gordon, C. L., Archer, D. B., Jeenes, D. J., Doonan, J. H., Wells, B., Trinci, A. P. & Robson, G. D. (2000a). A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *J Microbiol Methods* **42**, 39-48.
- Gordon, C. L., Khalaj, V., Ram, A. F., Archer, D. B., Brookman, J. L., Trinci, A. P., Jeenes, D. J., Doonan, J. H., Wells, B., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. & Robson, G. D. (2000b). Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology* **146** (Pt 2), 415-426.
- Grant, C. M. & Hinnebusch, A. G. (1994). Effect of sequence context at stop codons on efficiency of reinitiation in *GCN4* translational control. *Mol Cell Biol* **14**, 606-618.
- Gritzali, M. & Brown Jr, R.D. (1979). The cellulase system of *Trichoderma*: relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. *Adv Chem Ser* **181**, 237-260.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M.D., Mateos, P.F., Bridge, P.D., Monte, E. & García-Acha, I. (1997). Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3189-3198.
- Grundmann, O., Mosch, H. U. & Braus, G. H. (2001). Repression of *GCN4* mRNA translation by nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 25661-25671.
- Guex, N., Diemand, A. & Peitsch, M.C. (1999). Protein modelling for all. *Trend Biochem Sci* **24**, 364-367.
- Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J. K. (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**, 1383-1400.
- Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J. K. (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3735-3740.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A.B. & Chet, I. (1995). New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol Res* **99**, 441-446.
- Harikrishna, K., Jampates-Beale, R., Milligan, S.B. & Gasser, C.S. (1996). An endochitinase gene expressed at high levels in the stylar transmitting tissue of tomatoes. *Plant Mol Biol* **30**, 899-911.
- Harman G.E., Hayes C.K., Lorito M., Broadway R.M., Di Pietro A., Peterbauer C. & Tronsmo A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* **83**, 313-318.
- Harman, G.E. & Nelson, E.B. (1994). Mechanisms of protection of seed and seedlings by biological seed treatments: implications for practical disease control. En: *Seed treatment: Progress and prospects*. T. Martin (Ed.). 283-292. British Crop Protection Council Monograph No. 57, Canterbury, U.K.

- Harman, G.E. (1992). Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. *J Plant Nutr* **15**, 835-843.
- Harman, G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. *Plant Dis* **84**, 377-393.
- Harman, G.E., Taylor, A.G. & Stasz, T.E. (1989). Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Dis* **73**, 631-637.
- Harrison, P.M. & Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Bioch Biophys Acta* **1275**, 161-203.
- Henrique-Silva, F., El Gogary, S., Carle-Urioste, J.C., Matheucci Jr., E., Crivellaro, O. & El-Dorry, H. (1996). Two regulatory Regions Controlling Basal and Cellulose-Induced Expression of the Gene Encoding Cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* Are Adjacent to Its TATA Box. *BBRC* **228**, 229-237.
- Herrera-Estrella, A., Goldman, G. H., van Montagu, M. & Geremia, R. A. (1993). Electrophoretic karyotype and gene assignment to resolved chromosomes of *Trichoderma* spp. *Mol Microbiol* **7**, 515-521.
- Hinnebusch, A. G. (1997). Translational regulation of yeast *GCN4*. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J Biol Chem* **272**, 21661-21664.
- Hiraga, S., Ito, H., Yamakawa, H., Ohtsubo, N., Seo, S., Mitsuhara, I., Matsui, H., Honma, M. & Ohashi, Y. (2000). An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 210-216.
- Hoffmann, B., Valerius, O., Andermann, M. & Braus, G. H. (2001). Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpcA* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **12**, 2846-2857.
- Hoopes, B. C., Bowers, G. D. & Di Visconte, M. J. (2000). The two *Saccharomyces cerevisiae* *SUA7* (TFIIB) transcripts differ at the 3'-end and respond differently to stress. *Nucleic Acids Res* **28**, 4435-4443.
- Hoyos, M. E. & Zhang, S. (2000). Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol* **122**, 1355-1363.
- Hückelhoven, R. & Kogel, K. H. (2003). Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta* **216**, 891-902.
- Huie, M. A., Scott, E. W., Drazinic, C. M., Lopez, M. C., Hornstra, I. K., Yang, T. P. & Baker, H. V. (1992). Characterization of the DNA-binding activity of GCR1: in vivo evidence for two GCR1-binding sites in the upstream activating sequence of TPI of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**, 2690-2700.
- Hurtado, C. A. & Rachubinski, R. A. (1999). *MHY1* encodes a C2H2-type zinc finger protein that promotes dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **181**, 3051-3057.
- Hynes, M. J., Corrick, C. M., Kelly, J. M. & Littlejohn, T. G. (1988). Identification of the sites of action for regulatory genes controlling the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **8**, 2589-2596.
- Ilmén, M., Onnela, M. L., Klemsdal, S., Keranen, S. & Penttilä, M. (1996b). Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Mol Gen Genet* **253**, 303-314.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M. L. & Penttilä, M. E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1298-1306.
- Ilmén, M., Thrane, C. & Penttilä, M. (1996a). The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol Gen Genet* **251**, 451-460.

- Inbar, J. & Chet, I. (1992).** Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J Bacteriol* **174**, 1055-1059.
- Inbar, J. & Chet, I. (1995).** The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* **141**, 2823-2829.
- Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Suginami, K. & Imayasu, S. (2000).** Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet* **37**, 373-379.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C. S., Shi, W. & Zhu, J. K. (2000).** SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* **12**, 1667-1678.
- Ito, Y., Kaku, H. & Shibuya, N. (1997).** Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labelling. *The Plant Journal* **12**, 347-356.
- Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pindsdorf, E., Leah, R., Schell, J. & Maas, C. (1995).** Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* **8**: 91-109.
- Janecek, S. & Sevcik, J. (1999).** The evolution of starch-binding domain. *FEBS Lett* **456**, 119-125.
- Jia, Y. & Martin, G. B. (1999).** Rapid transcript accumulation of pathogenesis-related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease-resistant tomato plants. *Plant Mol Biol* **40**, 455-465.
- Jousse, C., Bruhat, A., Carraro, V., Urano, F., Ferrara, M., Ron, D. & Fafournoux, P. (2001).** Inhibition of CHOP translation by a peptide encoded by an open reading frame localized in the chop 5'UTR. *Nucleic Acids Res* **29**, 4341-4351.
- Kasprzewska, A. (2003).** Plant Chitinases-Regulation and Function. *Cell Mol Biol Lett* **7**, 1137-1151.
- Kelly, J. M. & Hynes, M. J. (1985).** Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **4**, 475-479.
- Khalaj, V., Brookman, J. L. & Robson, G. D. (2001).** A study of the protein secretory pathway of *Aspergillus niger* using a glucoamylase-GFP fusion protein. *Fungal Genet Biol* **32**, 55-65.
- Kim, S., Ahn, I. P. & Lee, Y. H. (2001).** Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1340-1346.
- Kizis, D., Lumberras, V. & Pages, M. (2001).** Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett* **498**, 187-189.
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. & Silva, H. (2000).** Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8849-8855.
- Kloepper, J. W., Zablutowicz, R.M., Tipping, E.M. & Lifshitz, R. (1991).** Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En: *The rhizosphere and plant growth*. D.L. Keister & Cregan P.B. (Eds.). 315-326. Kluwer, Dordrecht.
- Knogge, W. (1996).** Fungal Infection of Plants. *Plant Cell* **8**, 1711-1722.
- Komar, A. A., Lesnik, T. & Reiss, C. (1999).** Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Lett* **462**, 387-391.
- Kozak, M. (1987a).** An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**, 8125-8148.

- Kozak, M. (1987b).** Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol Cell Biol* **7**, 3438-3445.
- Kozak, M. (1987c).** At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* **196**, 947-950.
- Kozak, M. (1989a).** The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**, 229-241.
- Kozak, M. (1989b).** Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**, 5134-5142.
- Kozak, M. (1989c).** Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eukaryotic cell-free translation systems. *Mol Cell Biol* **9**, 5073-5080
- Kozak, M. (1991a).** A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr* **1**, 111-115.
- Kozak, M. (1991b).** Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. *Gene Expr* **1**, 117-125.
- Kozak, M. (1991c).** Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* **266**, 19867-19870.
- Kozak, M. (1992).** A consideration of alternative models for the initiation of translation in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**, 385-402.
- Kozak, M. (1999).** Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**, 187-208.
- Kozak, M. (2001a).** New ways of initiating translation in eukaryotes? *Mol Cell Biol* **21**, 1899-1907.
- Kozak, M. (2001b).** A progress report on translational control in eukaryotes. *Sci STKE* **2001**, PE1.
- Kubicek, C.P. & Penttilä, M.E. (1998).** Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 49-67. Taylor & Francis Ltd. London.
- Kubicek-Pranz, E.M. (1998).** Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Kubicek & Harman (Eds.). 95-111. Taylor & Francis Ltd. London.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E. & Börner, T. (1995).** PCR-fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiol Res* **150**, 363-371.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T. & 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.
- Kullnig, C., Mach, R. L., Lorito, M. & Kubicek, C. P. (2000).** Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2232-2234.
- Kulmburg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J. & Felenbok, B. (1993).** Specific binding sites in the alcR and alcA promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **7**, 847-857.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lapsker, Z. & Elad, Y. (2000). Involvement of active oxygen species and antioxidant enzymes in the disease caused by *Botrytis cinerea* on bean leaves and in its biological control by means of *Trichoderma harzianum* T39. 6th IOBC/EFPP Biocontrol Workshop. Sevilla, España.
- Laugé, R. & De Wit, P. J. (1998). Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal Genet Biol* **24**, 285-297.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J. & Ward, E. (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* **16**, 223-233.
- Le Hir, H., Nott, A. & Moore M. (2003). How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *TRENDS Biochem Sciences* **28**, 215-220.
- Leuchtmann, A., Petrini, O. & Samuels, G.J. (1996). Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycología* **88**, 384-394.
- Lewis, J.A. & Papavizas, G.C. (1983). Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. in natural substrates. *Can J Microbiol* **30**, 1-6.
- Lewis, J.A. & Papavizas, G.C. (1984). Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. in natural substrates. *Can J Microbiol* **30**, 1-7.
- Liang, P. & Pardee, A.B. (1997). Differential display methods and protocols. *Methods in molecular biology*. Vol. 85. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Limón, M. C., Lora, J. M., García, I., de la Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T. & Pintor-Toro, J. A. (1995). Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **28**, 478-483.
- Limón, M.C. (1999). Quitinasas CHIT33 y CHIT42 de *Trichoderma harzianum*. Aplicaciones en el control biológico y la biotecnología. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Limón, M.C., Pintor-Toro, J.A. & Benítez, T. (1999). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* **89**, 254-261.
- Lora, J. M., De la Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T. & Pintor-Toro, J. A. (1995). Molecular characterization and heterologous expression of an endo-beta-1, 6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol Gen Genet* **247**, 639-645.
- Lorito, M. (1998). Chitinolytic enzymes and their genes. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 73-92. Taylor & Francis Ltd. London.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. & Kubicek, C. P. (1996a). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* **178**, 6382-6385.
- Lorito, M., Harman, G., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L. & Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* **83**, 302-307.
- Lorito, M., Mach, R. L., Sposato, P., Strauss, J., Peterbauer, C. K. & Kubicek, C. P. (1996b). Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14868-14872.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C. K. & Harman, G. E. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* **140** (Pt 3), 623-629.

- Lorito, M., Woo, S. L., García, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F. & Fernández, I. G. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7860-7865.
- Lotan, T., Ori, N. & Fluhr R. (1989). Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* **1**, 881-817.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Luna, R. (1995). Estudio sobre la función del gen *tas14*, inducible por estrés salino y ácido abscísico en *Lycopersicon esculentum*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Luo, Z. & Sachs, M. S. (1996). Role of an upstream open reading frame in mediating arginine-specific translational control in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **178**, 2172-2177.
- Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S. L., Zeilinger, S., Kullnig, C. M., Lorito, M. & Kubicek, C. P. (1999). Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1858-1863.
- Mach, R. L., Schindler, M. & Kubicek, C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet* **25**, 567-570.
- Mach, R. L., Strauss, J., Zeilinger, S., Schindler, M. & Kubicek, C. P. (1996). Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol* **21**, 1273-1281.
- Mach, R.L. & Zeilinger, S. (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 515-522.
- Mager, W. H. & De Kruijff, A. J. (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev* **59**, 506-531.
- Maiti, D., Dasgupta, B. & Sen, C. (1991). Antagonism of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* isolates to *Sclerotium rolfsii* and biological control of stem rot of ground nut and betelvine. *J Biol Control* **5**, 105-109.
- Maleck, K. & Dietrich, R. A. (1999). Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci* **4**, 215-219.
- Mandels, M., Parrish, F. W. & Reese, E. T. (1962). Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J Bacteriol* **83**, 400-408.
- Mäntylä, A., Paloheimo, M. & Suominen, P. (1998). Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 291-304. Taylor & Francis Ltd. London.
- Mäntyllä, A. L., Rossi, K. H., Vanhanen, S. A., Penttilä, M. E., Suominen, P. L. & Nevalainen, K. M. (1992). Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant *Trichoderma longibrachiatum* (*reesei*) strains. *Curr Genet* **21**, 471-477.
- Margolles-Clark, E., Hayes, C. K., Harman, G. E. & Penttila, M. (1996). Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2145-2151.
- McCarter, J.D. & Withers, S.G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* **4**, 885-892.

- McCarthy, J. E. (1998). Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1492-1553.
- McLusky, S., Bennet, M.H., Beale, M.H., Lewis, M.J., Gaskin, P. & Mansfield, J.W. (1999). Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal* **17**, 523-534.
- Meijer, H. A. & Thomas, A. A. (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J* **367**, 1-11
- Messeguer, J. (2002). Plantas transgénicas de arroz. Evaluación y perspectivas. Congreso Nacional de Biotecnología. Sevilla, España.
- Migheli, Q., González-Candelas, L. Dealessi, L. Camponogara, A. & Ramón, D. (1998). Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the β -1, 4-endoglucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Phytopathology* **88**, 673-677.
- Miguel, E., Poza-Carrión, C., López-Solanilla, E., Aguilar, I., Llama-Palacios, A., García-Olmedo, F. & Rodríguez-Palenzuela, P. (2000). Evidence against a direct antimicrobial role of H₂O₂ in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 421-429.
- Mikolajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszynska, G., Klessig, D. F. & Dobrowolska, G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* **12**, 165-178.
- Minetoki, T., Nunokawa, Y., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C. & Tamura, G. (1996). Deletion analysis of promoter elements of the *Aspergillus oryzae* *agdA* gene encoding alpha-glucosidase. *Curr Genet* **30**, 432-438.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**, 405-410.
- Mittler, R., Herr, E. H., Orvar, B. L., van Camp, W., Willekens, H., Inze, D. & Ellis, B. E. (1999a). Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14165-14170.
- Mittler, R., Lam, E., Shulaev, V. & Cohen, M. (1999b). Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol Biol* **39**, 1025-1035.
- Mohan, R., Bajar, A. M. & Kolattukudy, P. E. (1993a). Induction of a tomato anionic peroxidase gene (*tap1*) by wounding in transgenic tobacco and activation of *tap1/GUS* and *tap2/GUS* chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol Biol* **21**, 341-354.
- Mohan, R., Vijayan, P. & Kolattukudy, P. E. (1993b). Developmental and tissue-specific expression of a tomato anionic peroxidase (*tap1*) gene by a minimal promoter, with wound and pathogen induction by an additional 5'-flanking region. *Plant Mol Biol* **22**, 475-490
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* **4**, 1-4.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Frances, J., Alemany, J., Llorente, I. & Moragrega, C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int Microbiol* **5**, 169-175.
- Mora, A. & Earle, E.D. (2001). Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 306-310.
- Morris, D. R. & Geballe, A. P. (2000). Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* **20**, 8635-8642.

- Murashige, Y. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**, 473-479.
- Muro-Pastor, M. I., González, R., Strauss, J., Narendja, F. & Scazzocchio, C. (1999). The GATA factor AreA is essential for chromatin remodelling in a eukaryotic bidirectional promoter. *Embo J* **18**, 1584-1597.
- Neale, A.D., Wahleithner, J.A., Lund, M., Bonnett, H.T., Kelly, A., Meeks-Wagner, D.R., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. (1990). Chitinase, β -1, 3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* **2**: 673-684.
- Nehlin, J. O. & Ronne, H. (1990). Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *Embo J* **9**, 2891-2898.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. & Hancock, J. T. (2002b). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* **53**, 1237-1247.
- Neustroev, K. N., Valter, S. N., Timchenko, N. V., Firsov, L. M., Golubev, A. M. & Khokhlov, S. E. (1993). Adsorption of glucoamylase from *Aspergillus awamori* X-100/D27 on cell walls. *Biochem Mol Biol Int* **30**, 115-120.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. & Mosinger, E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol* **108**, 17-27.
- Ohme-Takagi, M. & Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182.
- Okuda, T. & Fujiwara, M. (1982). Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1811-1822.
- Oliveira, C. C. & McCarthy, J. E. (1995). The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. A short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 8936-8943.
- Osbourn, A. E. (1996a). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- Osbourn, A. E., Bowyer, P. & Daniels, M. J. (1996b). Saponin detoxification by plant pathogenic fungi. *Adv Exp Med Biol* **404**, 547-555.
- Ousley, M.A., Lynch, J.M. & Whypps, J.M. (1993). Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. *Microb. Ecol.* **26**: 277-285.
- Palamarczyk, M., Maras, M., Contreras, R. & Kruszewska, J. (1998). Protein secretion and glycosylation in *Trichoderma*. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Kubicek & Harman (Eds.). 121-133. Taylor & Francis Ltd. London.
- Papavizas, G.C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann Rev Phytopathol* **23**, 23-54.
- Pardo, J. M., Polaina, J. & Jiménez, A. (1986). Cloning of the *STA2* and *SGA* genes encoding glucoamylases in yeasts and regulation of their expression by the *STA10* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **14**, 4701-4718.

- Park, J. M., Park, C. J., Lee, S. B., Ham, B. K., Shin, R. & Paek, K. H. (2001).** Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* **13**, 1035-1046.
- Parker, J. M. & Hodges, R. S. (1991).** Prediction of surface and interior regions in proteins--Part II: Predicting secondary structure in regions bound by surface exposed regions. *Pept Res* **4**, 355-363.
- Parveen, S., Ehteshamul Haque, S. & Ghaffar, A. (1993).** Biological control of *Meloidoyne javanica* on tomato and okra soil infected with *Fusarium oxysporum*. Pakistan. *J Nematol* **11**, 151-156.
- Paz, I., Abramovitz, L. & Choder, M. (1999).** Starved *Saccharomyces cerevisiae* cells have the capacity to support internal initiation of translation. *J Biol Chem* **274**, 21741-21745.
- Penttilä, M. (1998).** Heterologous protein production in *Trichoderma*. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek & Harman (Eds.). 365-379. Taylor & Francis Ltd. London.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Ratto, M., Salminen, E. & Knowles, J. (1987).** A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**, 155-164.
- Peterbauer, C. K., Brunner, K., Mach, R. L. & Kubicek, C. P. (2002a).** Identification of the N-acetyl-D-glucosamine-inducible element in the promoter of the *Trichoderma atroviride nag1* gene encoding N-acetyl-D-glucosaminidase. *Mol Genet Genomics* **267**, 162-170.
- Peterbauer, C. K., Litscher, D. & Kubicek, C. P. (2002b).** The *Trichoderma atroviride seb1* (stress response element binding) gene encodes an AGGGG-binding protein which is involved in the response to high osmolarity stress. *Mol Genet Genomics* **268**, 223-231.
- Peterbauer, C. K., Lorito, M., Hayes, C. K., Harman, G. E. & Kubicek, C. P. (1996).** Molecular cloning and expression of the *nag1* gene (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Curr Genet* **30**, 325-331.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharma, S. B., Klessig, D. F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B. & Mundy, J. (2000).** *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Peumans, W.J., Proost, P., Swennen, R.L. & Van Damme, E.J.M. (2002).** The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acid for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiol* **130**, 1063-1072.
- Phadtare, S., Alsina, J. & Inouye, M. (1999).** Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol* **2**, 175-180.
- Polle, A. & Rennenberg, H. (1993).** Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. En: *Plant adaptation to environmental stress*. Mansfield, T., Fowden, L. & Stoddard, F. (Eds.). 263-273. London: Chapman & Hall.
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R. M., Roby, D. & Lam, E. (1999).** Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol Biol* **39**, 1243-1255.
- Prade, R. A., Ayoubi, P., Krishnan, S., Macwana, S. & Russell, H. (2001).** Accumulation of stress and inducer-dependent plant-cell-wall-degrading enzymes during asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**, 957-967.
- Pugh, B.F. (2000).** Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* **255**, 1-14.
- Radford, A., Stone, P.J. & Taleb, F. (1996).** Cellulase and amylase complexes. En: *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*. R. Brambl, R. & G. A. Marzluf (Eds.). 269-291. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.

- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., Gorton, D., Arst, H. N., Jr. & Scazzocchio, C. (1997). Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *Embo J* **16**, 3974-3986.
- Reid, C.P.P. (1990). Mycorrhizas. En: *The Rhizosphere*. J.M. Lynch (ed.). 281-315. Wiley, Chichester, England.
- Rey, M. (1998). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su utilización como agentes de control biológico. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Rey, M., Ohno, S., Pintor-Toro, J. A., Llobell, A. & 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 U S A* **95**, 6212-6216.
- Reymond, P., Kunz, B., Paul-Pletzer, K., Grimm, R., Eckerskorn, C. & Farmer, E.E. (1996). Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell* **8**, 2265-2276.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A. & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-967.
- Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* **116**, 1-56.
- Rincón, A.M. & Benítez, T. (2000). Improved antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants. 5th European Conference on Fungal Genetics. Arcachon. Francia.
- Rivetta, A., Negrini, N. & Cocucci, M. (1997). Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant, Cell and Environment* **20**, 600-608.
- Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C. & Jackson, P.J. (1993). Plant metallothioneins. *Biochem J* **295**, 1-10.
- Roiger, D.J., Jeffers, S.N. & Caldwell, R.W. (1991). Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol Biochem* **23**, 353-359.
- Roxas, V. P., Lodhi, S. A., Garrett, D. K., Mahan, J. R. & Allen, R. D. (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol* **41**, 1229-1234.
- Ruis, H. & Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays* **17**, 959-965.
- Ruiz-Echevarría, M. J. & Peltz, S. W. (2000). The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell* **101**, 741-751.
- Rus, A.M., Estañ, M.T., Gisbert, C., García-Sogo, B., Serrano, R., Caro, M., Moreno, V., Bolarín, M.C. (2001). Expressing the yeast *HAL1* gene in tomato increases fruit yield and enhances K⁺/Na⁺ selectivity under salt stress. *Plant, Cell and Environment* **24**, 875-880.
- Rushton, P. J. & Somssich, I. E. (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 311-315.
- Sachs, A. B. (2000). Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. *Cell* **101**, 243-245.
- Sachs, M. S. (1998). Posttranscriptional control of gene expression in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **23**, 117-124.

- Sahai, A.S. & Manocha, M.S. (1993).** Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* **11**, 317-338.
- Saloheimo, M., Valkonen, M. & Penttilä, M. (2003).** Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Mol Microbiol* **47**, 1149-1161.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D. & Chet, I. (1995).** Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* **13**, 468-474.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuels, G.J. (1996).** *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Rev* **100**, 923-935.
- Samuels, G.J., Dood, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A. & Petrini, O. (2002).** *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **94**, 146-168.
- Sandermann, H., Jr. (2000).** Active oxygen species as mediators of plant immunity: three case studies. *Biol Chem* **381**, 649-653.
- Santerre-Henriksen, A.L., Even, S., Müller, C., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J. & Nielsen, J. (1999).** Study of the glucoamylase promoter in *Aspergillus niger* using green fluorescent protein. *Microbiology* **145**, 729-734.
- Sauer, J., Sigurskjold, B.W., Christensen, U., Frandsen, T.P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstorff, P. & Svensson, B. (2000).** Glucoamylase: structure/function relationships and protein engineering. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 275-293.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. & Manners, J.M. (2000).** Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11655-11660.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, CK., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E. & 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.
- Schützendübel, A. & Polle, A. (2002).** Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* **53**, 1351-1365.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L. & Polle, A. (2001).** Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol* **127**, 887-898.
- Serrano, R. & Rodríguez-Navarro, A. (2001).** Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 399-404.
- Serrano, R., Culiñáz-Maciá, F.A. & Moreno, V. (1999).** Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae* **78**, 261-269.
- Shanmugam, V., Sriram, S., Babu, S., Nandakumar, R., Raguchander, T., Balasubramanian, P. & Samiyappan, R. (2001).** Purification and characterization of an extracellular alpha-glucosidase protein from *Trichoderma viride* which degrades a phytotoxin associated with sheath blight disease in rice. *J Appl Microbiol* **90**, 320-329.

- Sharon, A., Fuchs, Y. & Anderson, J. D. (1993). The Elicitation of Ethylene Biosynthesis by a *Trichoderma* Xylanase Is Not Related to the Cell Wall Degradation Activity of the Enzyme. *Plant Physiol* **102**, 1325-1329.
- Shen, W. C. & Ebbole, D. J. (1997). Cross-Pathway and Pathway-Specific Control of Amino Acid Biosynthesis in *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* **21**, 40-49.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. & Zhu, J.K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6896-6901.
- Shi, H., Lee, B. H., Wu, S. J. & Zhu, J. K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **21**, 81-85.
- Siedenberg, D., Mestric, S., Ganzlin, M., Schmidt, M., Punt, P. J., van den Hondel, C. & Rinas, U. (1999). *GlaA* promoter controlled production of a mutant green fluorescent protein (S65T) by recombinant *Aspergillus niger* during growth on defined medium in batch and fed-batch cultures. *Biotechnol Prog* **15**, 43-50.
- Singh, K.B., Foley, R. C. & Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 430-436.
- Sivan, A. & Chet, I. (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J Gen Microbiol* **135**, 675-682.
- Southall, S. M., Simpson, P. J., Gilbert, H. J., Williamson, G. & Williamson, M. P. (1999). The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett* **447**, 58-60.
- Stephan, U.W., Schmidke, I., Stephan, V.W. & Scholz, G. (1996). The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *Biometals* **9**, 84-90.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. & Fritig, B. (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**, 687-706.
- Strompen, G., Gruner, R. & Pfitzner, U. M. (1998). An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol Biol* **37**, 871-883.
- Svensson, B. (1988). Regional distant sequence homology between amylases, alpha-glucosidases and transglucanosylases. *FEBS Lett* **230**, 72-76.
- Svensson, B., Larsen, K. & Gunnarsson, A. (1986). Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem* **154**, 497-502.
- Tabata, K., Kashiwagi, S., Mori, H., Ueguchi, C. & Mizuno, T. (1997). Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* **1326**, 1-6.
- Takahashi, K., Isobe, M. & Muto, S. (1997). An increase in cytosolic calcium ion concentration precedes hypoosmotic shock-induced activation of protein kinases in tobacco suspension culture cells. *FEBS Lett* **401**, 202-206.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. & Arst, H. N., Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *Embo J* **14**, 779-790.
- Torres-Schumann, S., Godoy, J. A. & Pintor-Toro, J. A. (1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol Biol* **18**, 749-757.

- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tréton, B., Blanchin-Roland, S., Lambert, M., Lepingle, A. & Gaillardin, C. (2000).** Ambient pH signalling in ascomycetous yeasts involves homologues of the *Aspergillus nidulans* genes *palF* and *palH*. *Mol Gen Genet* **263**, 505-513.
- Tronchet, M., Ranty, B., Marco, Y. & Roby, D. (2001).** HSR203 antisense suppression in tobacco accelerates development of hypersensitive cell death. *Plant J* **27**, 115-127.
- Van Assche, F. & Clijsters, H. (1986).** Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Plant Physiology* **125**, 355-360.
- Van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A. & de Vries, S.C. (2001).** N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol* **125**, 1880-1890.
- Van Hengel, A.J., van Kammen, A. & de Vries, S.C. (2002).** A relationship between seed development, Arabinogalactan-protein (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol Plant* **114**, 637-644.
- Van Steveninck, R.F.M., Babare, A., Fernando, D.R. & Van Steveninck, M.E. (1993).** The binding of zinc in root cells of crop plants by phytic acid. *Plant Soil* **155/156**, 525-528.
- Veena, Reddy, V. S. & Sopory, S. K. (1999).** Glyoxalase I from *Brassica juncea*: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *Plant J* **17**, 385-395.
- Vega Laso, M. R., Zhu, D., Sagliocco, F., Brown, A. J., Tuite, M. F. & McCarthy, J. E. (1993).** Inhibition of translational initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader. *J Biol Chem* **268**, 6453-6462.
- Venisse, J. S., Gullner, G. & Brisset, M. N. (2001).** Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol* **125**, 2164-2172.
- Vidigal Duarte, F. (2001).** Transformación genética en melón (*Cucumis melo* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) con los genes *chit42* y *bgn16.2* para la obtención de plantas resistentes a enfermedades fúngicas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Vilela, C. & McCarthy, J. E. (2003).** Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region. *Mol Microbiol* **49**, 859-867.
- Vilela, C., Linz, B., Rodrigues-Pousada, C. & McCarthy, J. E. (1998).** The yeast transcription factor genes *YAP1* and *YAP2* are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability. *Nucleic Acids Res* **26**, 1150-1159.
- Vilela, C., Ramírez, C. V., Linz, B., Rodrigues-Pousada, C. & McCarthy, J. E. (1999).** Post-termination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability. *Embo J* **18**, 3139-3152.
- Viterbo, A., Haran, S., Friesem, D., Ramot, O. & Chet, I. (2001).** Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiol Lett* **200**, 169-174.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chemin, L. & Chet, I. (2002).** Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 549-556.
- Vivier, M. A., Sollitti, P. & Pretorius, I. S. (1999).** Functional analysis of multiple AUG codons in the transcripts of the *STA2* glucoamylase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **261**, 11-20.

- Vranova, E., Inze, D. & Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* **53**, 1227-1236.
- Weast, R.C. (1984). CRC Handbook of chemistry and physics, 64th edn. Boca Raton, CRC Press.
- Webb, E.C. (1992). Enzyme nomenclature. 863. Academic Press. San Diego.
- Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A. & Beer, S. V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**, 85-88.
- Welch, E. M. & Jacobson, A. (1999). An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast SPT10 mRNA. *Embo J* **18**, 6134-6145.
- Wiatrowski, H. A. & Carlson, M. (2003). *Yap1* accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **2**, 19-26.
- Wink, M. (1993). The plant vacuole: a multifunctional compartment. *J Exp Bot* **44** (Suppl.) 231-246.
- Wirsel, S., Lachmund, A., Wildhardt, G. & Ruttkowski, E. (1989). Three alpha-amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization. *Mol Microbiol* **3**, 3-14.
- Woo, S., Fogliano, V., Scala, F. & Lorito, M. (2002). Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 353-356.
- Woo, S.L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G.E., Kubicek, C.P., Del Sorbo, G. & Lorito, M. (1999). Disruption of the *ech42* (Endochitinase-Encoding) Gene Affects Biocontrol Activity in *Trichoderma harzianum* P1. *MPMI* **12**, 419-429.
- Wyss, P., Boller, T. & Wiemken, A. (1992). Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. *Plant soil* **147**, 159-162.
- Yeh, S., Moffat, B.A., Griffit, M., Xiong, F., Yang, D.S.C., Wiseman, S.B., Sarhan, F., Danyluk, J., Xue, Y.Q., Hew, C.L., Doherty-Kirby, A. & Lajoie, G. (2000). Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiol* **124**, 1251-1263.
- Xiong, L. & Zhu, J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ* **25**, 131-139.
- Xiong, L., Schumaker, K. S. & Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14 Suppl**, S165-183.
- Yamamoto, S., Suzuki, K. & Shinshi, H. (1999). Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. *Plant J* **20**, 571-579.
- Yamasaki, Y., Elbein, A. D. & Konno, H. (1995). Purification and Properties of α -Glucosidase from *Trichoderma viride*. *Biosci Biotech Biochem* **59**, 2181-2182.
- Yamashita, I. & Fukui, S. (1985). Transcriptional control of the sporulation-specific glucoamylase gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**, 3069-3073.
- Yoshida, K., Kaothien, P., Matsui, T., Kawaoka, A. & Shinmyo, A. (2003). Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 665-670.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. & Shigeoka, S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol* **123**, 223-234.
- Yubero-Serrano, E. M., Cordero de Mesa, M., de los Santos, B., Romero, F., Rey, M., Llobel, A., Mercado, J. A., Pliego, F., Muñoz, J. & Caballero, J. L. (2002). Obtención de plantas transgénicas de

fresa con genes antifúngicos de *Trichoderma* como alternativa a tratamientos químicos no respetuosos con el medio ambiente. Congreso Nacional de Biotecnología. Sevilla, España.

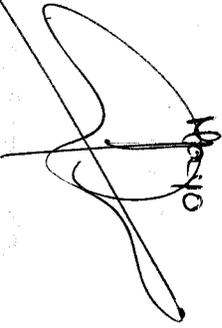
- Yun, B.W., Huh, G.H., Lee, H.S., Kwon, S.Y., Jo, J.K., Kim, J.S., Cho, K.Y. & Kwak, S.S. (2000).** Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweet potato peroxidases. *J Plant Physiol* **156**: 504-509.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M. & Kubicek, C. P. (1999).** Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet Biol* **26**, 131-140.
- Zeilinger, S., Mach, R. L. & Kubicek, C. P. (1998).** Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose. *J Biol Chem* **273**, 34463-34471.
- Zeilinger, S., Mach, R. L., Schindler, M., Herzog, P. & Kubicek, C. P. (1996).** Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* **271**, 25624-25629.
- Zhang, S. & Klessig, D. F. (2000).** Pathogen-induced MAP kinases in tobacco. *Results Probl Cell Differ* **27**, 65-84.
- Zhang, S. & Klessig, D. F. (2001).** MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* **6**, 520-527.
- Zhang, S. & Liu, Y. (2001).** Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* **13**, 1877-1889.
- Zhang, S., Du, H. & Klessig, D. F. (1998).** Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* **10**, 435-450.
- Zhang, S., Liu, Y. & Klessig, D. F. (2000).** Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J* **23**, 339-347.
- Zhao, J., Chen, Y. H. & Kwan, H. S. (2000).** Molecular cloning, characterization, and differential expression of a glucoamylase gene from the basidiomycetous fungus *Lentinula edodes*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2531-2535.
- Zhao, K. J. & Chye, M. L. (1999).** Methyl jasmonate induces expression of a novel *Brassica juncea* chitinase with two chitin-binding domains. *Plant Mol Biol* **40**, 1009-1018.
- Zhou, W., Edelman, G. M. & Mauro, V. P. (2001).** Transcript leader regions of two *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs contain internal ribosome entry sites that function in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1531-1536.
- Zhu, B., Choi, D. W., Fenton, R. & Close, T. J. (2000).** Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Mol Gen Genet* **264**, 145-153.
- Zhu, J. K. (2001a).** Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 401-406.
- Zhu, J. K. (2001b).** Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* **6**, 66-71.
- Zhu, J. K. (2002).** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247-273.
- Zhu, Q., Maher, E.A., Masoud, S., Dixon, R.A. & Lamb, C. (1994).** Enhanced Protection Against Fungal Attack by Constitutive Co-expression of Chitinase and Glucanase Genes in Transgenic Tobacco. *BioTechnology* **12**, 807-812.
- Zimand, G., Elad, Y. & Chet, I. (1996).** Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* **86**, 1255-1260.

MARIA DE LAS MERCEDES DANA JIMÉNEZ
"Estudio de genes de Trikotperua varziawuwa relacionados
con estres un trikotperua. Analisis funcional de la expresion
heterologa de los quitinasas CHIT 33 y CHIT 42 en plantas de tabaco."

21

Mayo

de 2004



EL PRESIDENTE,

A. Vique

