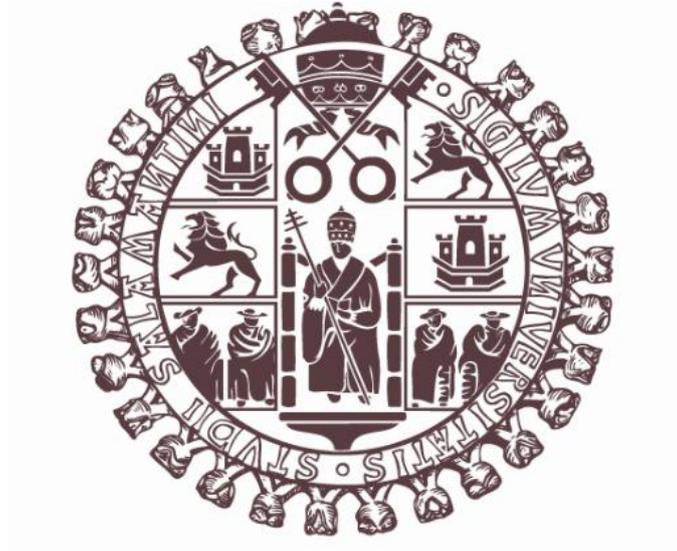


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

INSTITUTO CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES
AGRARIAS (CIALE)

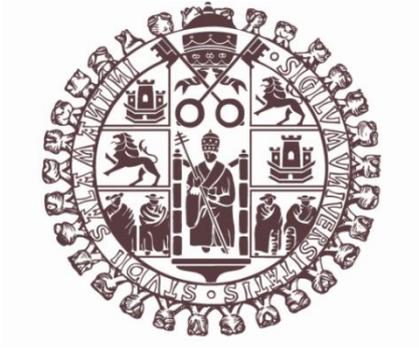
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



**“Estudio transcriptómico de la interacción *Trichoderma*-tomate.
Expresión del gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma
harzianum* y su papel en el metabolismo del nitrógeno y la respuesta de
defensa de la planta”**

Sara Domínguez Hernández

2014



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

INSTITUTO CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES
AGRARIAS (CIALE)

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

**“Estudio transcriptómico de la interacción *Trichoderma*-tomate.
Expresión del gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma
harzianum* y su papel en el metabolismo del nitrógeno y la respuesta de
defensa de la planta”**

**Memoria presentada por Sara Domínguez Hernández para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.**

Salamanca, 15 de Octubre de 2014

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

CERTIFICAMOS:

Que la memoria titulada **“Estudio transcriptómico de la interacción *Trichoderma*-tomate. Expresión del gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma harzianum* y su papel en el metabolismo del nitrógeno y la respuesta de defensa de la planta”**, presentada por Sara Domínguez Hernández para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y el Instituto Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos este certificado en Salamanca a 10 de Octubre de 2014.

Fdo: Enrique Monte Vázquez

Fdo: M. Belén Rubio Pérez

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“Estudio transcriptómico de la interacción *Trichoderma*-tomate. Expresión del gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma harzianum* y su papel en el metabolismo del nitrógeno y la respuesta de defensa de la planta”**, presentada por Sara Domínguez Hernández para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. Enrique Monte Vázquez y M. Belén Rubio Pérez, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

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

Fdo: Luis R. Fernández Lago

“Lo bello del desierto es que en algún lugar esconde un pozo”

“El principito” Antoine de Saint Exupéry (escritor y aviador francés)

AGRADECIMIENTOS

Cualquier proyecto se logra con la ayuda, el apoyo y el cariño de muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

Al Dr. Enrique Monte, director de esta Tesis Doctoral, por abrirme las puertas de su laboratorio, darme mi primera oportunidad y creer en mí. Gracias por todo tu tiempo, pero sobre todo, por ese optimismo que te caracteriza, ha sido básico en muchos momentos.

A la Dra. Belén Rubio, directora y compañera de esta Tesis Doctoral, por darme su apoyo, profesional y emocional, durante todos estos años.

A Rosa, por tener siempre el despacho abierto para cualquier duda o asunto que me ha surgido. A Carlos, por prestarme su ayuda cuando la he necesitado.

A Santi, Rosa Elena y Mónica por todo su esfuerzo con los transformantes y por su hospitalidad en mi estancia en Ponferrada.

A Aurelio Gómez y su grupo de Castellón por hacerme sentir tan bien en mis estancias y poner todos sus recursos a mi disposición, en especial a Vicent y a Carlos, por todo lo aprendido y por todo lo vivido.

A todas las personas que me he cruzado en el lab y en el CIALE: Isabel Grondona, Isabel Chamorro, Inma, Marcia, Raúl, Narciso, Javier y Esclaudys.

Sin duda, una de las experiencias más valiosas de una Tesis ha sido conocer a mis compañeros, finalmente amigos, que me he ido encontrando a lo largo de este tiempo. Gracias a Eugenia por enseñarme mis primeros pinitos con los geles y porque en la distancia aún te sigues acordando, a Marta por su ayuda y todos los consejos. A aquel maravilloso tiempo en el que compartimos poyata: Joana, Jorge, Ila y Mariela (mi hermanita del otro lado del "Atlántico"), nunca nos faltó el buen humor, a pesar de los pesares. A Ana, Irene y Andrés, por su sentido del humor y amistad, lo habéis demostrado con creces. A mi timina Vega, que ha sido un gran apoyo en los malos momentos, pero también lo ha sido en los buenos.

A mis amigos: a Pensi, por hacerme ver que podría lograr cualquier cosa que me propusiese, por muy difícil que lo pintaran; a Mari, por su amistad y guasa, sobre todo con las membranas.... A Susana, Teresa, Marisol y a Dani, por estar conmigo desde el principio y compartir tantas y tantas cosas. A Bea y Fidel por su cariño y por hacerme siempre un huequito. A Fer e Isa, por ser los que más me levantan la moral; a

Ire, por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Me dejo nombres propios, pero ya sabéis que habéis formando parte de mi vida y por ello, de esto también.

A mi querido grupo de chuchines, habéis hecho que este último tiempo, quizás el más duro, haya sido mucho mejor llevadero. Por las salidas y entradas, paseos al parque, cenas no planeadas, allanamientos vecinales y el día a día. Aunque no valoréis como se merecen mis chistes...

A mis tios y primos, porque poco a poco lo vamos logrando.

A mis personitas no humanas: Pelusa, Miky, Ary y Kyra, por ser mis más fieles compañeros, por darme tantas alegrías, habéis sido y sois mi trocito de felicidad diaria.

A Oscar, eres un pilar fundamental en mi vida. Por toda tu paciencia, aguantar mis estados de ánimo, mis decaídas y por recoger siempre la toalla que muchas veces intenté tirar. Por sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mio y encargarte de todo. Ahora viene lo bueno. También a su familia, por su cariño.

A mis hermanos, Ignacio y Javier. Por estar siempre conmigo, quererme, apoyarme y ser mis amigos. Porque estoy orgullosa de vosotros y sois los mejores hermanos del mundo. Nos queda más de un viaje en cualquier rincón del mundo.

A mis padres, a los que les debo lo que tengo y lo que soy, y porque los admiro profundamente. A mi madre, por estar a mi lado y entenderme, por ser valiente, y como ya dije una vez: por hacer éxitos mis pequeños logros y anécdotas mis grandes fracasos. Eres un ejemplo de lucha y superación. A mi padre, por guiar siempre mis pasos y acompañarme cada día de mi vida. Porque eres mi inspiración y el espejo donde me quiero mirar.

A la Junta de Castilla y León que ha dado soporte económico para poder cumplir con este proyecto: a la financiación por parte de la Consejería de Educación y del Fondo Social Europeo.

“Me pregunto si las estrellas se iluminan con el fin de que algún día, cada uno pueda encontrar la suya”.

“El principito” Antoine de Saint Exupéry (escritor y aviador francés)

A los que más quiero

SIGLAS Y ABREVIATURAS

μg	microgramo
μg/mL	microgramo por mililitro
μL	microlitro
μm	micrometro
μM	micromolar
6PP	6-pentil-α-pirona
A	adenina
ABA	ácido abscísico
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	endonucleasa
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ADNr	ácido desoxirribonucleico ribosómico
ADP	adenosín difosfato
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNc	ácido ribonucleico complementario
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
atm	atmósfera
ATP	adenosín trifosfato
BLAST	<i>basic local alignment search tools</i>
C	citosina
c.s.p.	cantidad suficiente para
C/N	carbono y nitrógeno

CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CIA	cloroformo-alcohol isoamílico
cm	centímetro
CO₂	dióxido de carbono
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
dCTP	desoxicitosín trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino-tetracético
EE.UU.	Estados Unidos
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
ET	etileno
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
FC	<i>fold change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
g	gramo
<i>g</i>	aceleración de la gravedad terrestre
G	guanina
g/L	gramo por litro
GABA	ácido γ -aminobutírico
GO	<i>gene ontology</i>
GTP	guanosin trifosfato
HDO	oligonucleótidos de alta densidad

HR	respuesta hipersensible
IAA	ácido indolacético, auxina
IMI	<i>International Mycological Institute</i>
IPTG	isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido
ISR	resistencia sistémica inducida
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
JA	ácido jasmónico
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
Kb	kilobase
Kg	kilogramo
L	litro
M	molaridad
MAMPs	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
mg	miligramo
mg/mL	miligramo por mililitro
mJ	milijulio
mL	mililitro
mM	milimolar
MM	medio mínimo
Mpb	mega pares de bases
MTI	<i>MAMP-triggered immunity</i>
NBT	<i>NewBiotechnic, S.A.</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanogramo
ng/mL	nanogramo por mililitro

nM	nanomolar
nm	nanómetro
NUE	<i>Nitrogen Use Efficiency</i> (uso eficiente de nitrógeno)
OAA	oxalacetato
°C	grado centígrado
ORF	fase de lectura abierta
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDA	<i>potato dextrose agar</i>
PDB	<i>potato dextrose broth</i>
PEG	polietilénico
PEP	fosfoenolpiruvato
PGPR	rizobacterias promotoras del crecimiento
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
p/v	peso por volumen
RAPD	<i>random amplified polymorphism DNA-PCR</i>
RFLPs	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SA	ácido salicílico
SAR	resistencia sistémica adquirida
SCAR	<i>sequence-characterized amplified region</i>
SDS	dodecilsulfato sódico
spp.	especies

SSH	hibridación sustractiva supresiva
T	timina
TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Tris	tri-(hidroximetil) aminometano
U	unidades
V	voltios
v/v	volumen por volumen
x	número de veces de concentración
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. EL GÉNERO <i>Trichoderma</i>	3
1.1. MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA	3
1.2. APLICACIONES	4
2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE <i>Trichoderma</i>	7
2.1. CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS, OOMICETOS Y NEMATODOS FITOPATÓGENOS	7
2.1.1. COMPETICIÓN	7
2.1.2. MICOPARASITISMO	8
2.1.3. ANTIBIOSIS	9
2.2. RELACIÓN CON LAS PLANTAS	11
2.2.1. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO	12
2.2.2. RESPUESTA DE DEFENSA	13
2.2.3. RESISTENCIA A ESTRESSES AMBIENTALES	18
3. ÓMICAS	19
3.1. GENÓMICA	20
3.2. TRANSCRIPTÓMICA	20
3.2.1. ESTs	21
3.2.2. BÚSQUEDA DE GRUPOS ESPECÍFICOS DE GENES	21
3.2.3. SSH: SUSTRACCIÓN BASADA EN PCR E HIBRIDACIÓN SUBSTRACTIVA RÁPIDA (RaSH)	22
3.2.4. ARRAYS	23
3.3. PROTEÓMICA	24
3.4. METABOLÓMICA	25
4. AMIDASAS	26
5. LA IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO EN LAS PLANTAS	27
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. ORGANISMOS UTILIZADOS	35
1.1. PROCARIOTAS	35

1.2.	EUCARIOTAS	35
1.2.1.	CEPAS FUNGICAS DEL GÉNERO <i>Trichoderma</i>	35
1.2.2.	MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS.....	35
1.2.3.	TOMATE.....	36
2.	VECTORES PLASMÍDICOS	36
3.	MEDIOS DE CULTIVO.....	37
3.1.	MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.....	37
3.2.	MEDIOS DE CULTIVOS PARA HONGOS Y PLANTAS	37
4.	CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS.....	39
4.1.	CULTIVO.....	39
4.1.1.	<i>Trichoderma</i>	39
4.1.2.	CULTIVO DE PLANTAS DE TOMATE EN INTERACCIÓN CON <i>Trichoderma</i> .	41
4.2.	MANTENIMIENTO.....	43
4.2.1.	BACTERIAS	43
4.2.2.	HONGOS FILAMENTOSOS Y OOMICETOS.....	43
4.2.3.	TOMATE.....	43
5.	TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS	43
5.1.	TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	43
5.2.	TRANSFORMACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	44
5.2.1.	PREPARACIÓN DE PROTOPLASTOS	44
5.2.2.	TRANSFORMACIÓN	45
6.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	45
6.1.	EXTRACCIÓN DE ADN	45
6.1.1.	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. coli</i>	45
6.1.2.	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>Trichoderma</i>	46
6.2.	EXTRACCIÓN DE ARN.....	48
6.2.1.	MÉTODO DEL TRIZOL.....	48
6.2.2.	ARN PARA <i>MICROARRAYS</i>	49
7.	MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	49
7.1.	CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.....	49
7.2.	MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	50
7.2.1.	TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ADN	50

7.2.2.	TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ARN.....	51
7.3.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	52
7.3.1.	REACCIÓN CLÁSICA.....	52
7.3.2.	REACCIÓN CON POLIMERASAS DE ALTA FIDELIDAD	52
7.3.3.	REACCIÓN DE CADENA LARGA	52
7.3.4.	<i>Real Time</i> PCR.....	52
7.3.5.	OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	54
7.4.	ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	57
7.4.1.	ELECTROFORESIS DE ADN	57
7.4.2.	ELECTROFORESIS DE ARN	58
7.5.	PURIFICACIÓN.....	58
7.5.1.	FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	58
7.5.2.	ARN PARA <i>MICROARRAYS</i>	58
7.6.	SECUENCIACIÓN DE ADN.....	58
8.	EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN.....	59
8.1.	TRANSFERENCIA DE ADN DE GELES DE AGAROSA A MEMBRANAS (<i>Southern blot</i>).....	59
8.2.	DISEÑO DE <i>MICROARRAYS</i>	60
8.2.1.	<i>MICROARRAYS</i> DE <i>Trichoderma</i>	60
8.2.2.	<i>MICROARRAYS</i> DE TOMATE	60
8.3.	MARCAJE DE LAS SONDAS.....	60
8.3.1.	<i>Southern blot</i>	60
8.3.2.	<i>MICROARRAYS</i>	60
8.4.	PREHIBRIDACIÓN, HIBRIDACIÓN Y LAVADOS.....	61
8.4.1.	PREHIBRIDACIÓN DE MEMBRANAS	61
8.4.2.	HIBRIDACIÓN Y LAVADOS.....	61
8.5.	DETECCIÓN	62
8.5.1.	<i>Southern blot</i>	62
8.5.2.	<i>MICROARRAYS</i>	62
8.6.	REUTILIZACIÓN DE MEMBRANAS (<i>Southern blot</i>)	63
9.	ENSAYOS DE CRECIMIENTO, PIGMENTACIÓN Y ESPORULACIÓN DE <i>Trichoderma</i> . ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS TRANSFORMANTES.....	63
10.	CUANTIFICACIÓN DE AMONIO	63

11.	ENSAYOS ANTIFÚNGICOS <i>in vitro</i> EN CULTIVOS DUALES	64
12.	MEDIDA DE NITRÓGENO Y CARBONO EN PLANTAS DE TOMATE.....	64
13.	HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICA Y <i>SOFTWARES</i> UTILIZADOS	64
13.1.	BÚSQUEDA DE SECUENCIAS SIMILARES EN BASES DE DATOS	64
13.2.	VISUALIZACIÓN DE CROMATOGRAMAS.....	65
13.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	65
13.3.1.	DATOS OBTENIDOS EN <i>MICROARRAYS</i>	65
13.3.2.	DATOS OBTENIDOS EN OTROS ENSAYOS.....	66
13.4.	HERRAMIENTAS DE EDICIÓN	66
14.	CASAS COMERCIALES	66
CAPÍTULO 1		69
RESULTADOS.....		71
1.	EFFECTO DE DIFERENTES CEPAS DE <i>Trichoderma</i> EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE PLANTAS DE TOMATE.....	73
2.	GENES DE <i>Trichoderma</i> EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A PLANTAS DE TOMATE	74
2.1.	ANÁLISIS GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	75
2.2.	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE <i>T. hamatum</i> T7 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE	78
2.3.	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE <i>T. harzianum</i> T34 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE	80
2.4.	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE <i>T. virens</i> T87 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE	83
2.5.	CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE <i>Real Time</i> PCR.....	85
DISCUSIÓN		87
CAPÍTULO 2		97
RESULTADOS.....		99
1.	EFFECTO DE <i>T. parareesei</i> T6 EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE PLANTAS DE TOMATE	101
2.	GENES DE <i>T. parareesei</i> T6 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A PLANTAS DE TOMATE	102
2.1.	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE <i>T. parareesei</i> T6 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A PLANTAS DE TOMATE.....	102

2.2.	CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE <i>Real Time</i> PCR.....	106
3.	EFFECTO DE <i>T. parareesei</i> T6 EN LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE	107
	DISCUSIÓN	111
	CAPÍTULO 3	117
	RESULTADOS.....	119
1.	ANTECEDENTES	121
2.	OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>T. harzianum</i> T34 QUE EXPRESAN EL GEN <i>amdS</i> de <i>A.</i> <i>nidulans</i>	122
3.	CONFIRMACIÓN DE LOS TRANSFORMANTES OBTENIDOS.....	124
3.1.	MEDIANTE PCR	124
3.2.	ANÁLISIS <i>Southern blot</i> DE LOS TRANSFORMANTES.....	126
3.3.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>amdS</i> EN LOS TRANSFORMANTES.....	127
4.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS TRANSFORMANTES	128
5.	LIBERACIÓN DE AMONIO AL MEDIO DE CULTIVO.....	130
6.	EFFECTO DE LOS TRANSFORMANTES <i>amdS</i> de <i>Trichoderma</i> SOBRE PLANTAS DE TOMATE	131
6.1.	ENSAYOS <i>in vitro</i>	131
6.2.	ENSAYOS <i>in vivo</i>	131
6.3.	MEDIDA DEL NITRÓGENO Y CARBONO EN PLANTAS DE TOMATE	132
7.	ENSAYOS ANTIFÚNGICOS <i>in vitro</i> EN CULTIVOS DUALES.....	132
8.	ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE PLANTAS DE TOMATE EN SU INTERACCIÓN CON <i>T. harzianum</i> T34 Y LOS TRANSFORMANTES <i>amdS</i>	133
8.1.	ANÁLISIS GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	133
8.2.	GENES DE PLANTAS DE TOMATE EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A <i>T. harzianum</i> T34	135
8.3.	GENES DE PLANTAS DE TOMATE EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A LOS TRANSFORMATES <i>amdS6</i> Y <i>amdS122</i>	136
8.4.	CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE <i>Real Time</i> PCR.....	140
	DISCUSIÓN	143
	CONCLUSIONES	155
	BIBLIOGRAFÍA	161

INTRODUCCIÓN

1. EL GÉNERO *Trichoderma*

1.1. MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA

El género *Trichoderma* agrupa hongos filamentosos pertenecientes a la División Deuteromicota, cuyo principal atributo es la ausencia de ciclo sexual, y dentro de ésta, a la clase de los Hifomicetos, caracterizada por producir conidios o esporas asexuales a partir de células desnudas, sin la envoltura adicional de un cuerpo fructífero (Gams y col., 1987). No obstante, en algunos aislamientos se ha descrito el estado perfecto o sexual (teleomórfico) que es conocido con el nombre genérico de *Hypocrea* mientras que el estado asexual (anamórfico o mitospórico) se llama *Trichoderma*. Varias especies comunes han perdido su habilidad de reproducción sexual y se han convertido en especies clonales, como por ejemplo *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma parareesei* (Druzhinina y col., 2008, 2010; Samuels y col., 2010), aunque existen distintas publicaciones que señalan que la mayor parte de la diversidad genética de este género está representada por su forma sexual (Druzhinina y col., 2006; Kubicek y col., 2008; Jaklitsch, 2009, 2011).

Casi todas las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y emiten grandes cantidades de pequeños conidios verdes (Figura 1) o excepcionalmente hialinos, formados a partir de células conidiógenas enteroblásticas fialídicas (Kirk y col., 2001). Los conidióforos son muy ramificados (asemejándose a arbustos con forma piramidal), están tabicados y sus células contienen más de un núcleo. Los conidios son ovoides, con pared normalmente lisa (ocasionalmente rugosa) y con un solo núcleo. En determinadas condiciones de estrés, ya sea nutricional o por desecación, el micelio se diferencia en unas estructuras asexuales de resistencia denominadas clamidosporas. Estas estructuras son globosas, con pared rugosa y más gruesa que la de los conidios, y tienen gran importancia en la supervivencia del hongo (Lewis y Papavizas, 1984).

El género *Trichoderma* se describió por primera vez hace 220 años (Persoon, 1794). La taxonomía del género se basó en criterios morfológicos, lo que supuso una gran confusión e imprecisión, debido a su gran similitud fenotípica, a la hora de asignar nombres a las nuevas especies. El primer estudio importante, basado en criterios morfológicos, lo realizó Rifai (1969) poniendo un cierto orden al género y definiendo nueve agregados específicos. Más tarde, Bisset (1991) revisó las especies de *Trichoderma* existentes y propuso cinco nuevas secciones dentro del género. Desde entonces se han ido utilizando otros criterios para aclarar la situación taxonómica de *Trichoderma*. Se han usado los perfiles de isoenzimas (Zamir y Chet, 1985; Stasz y col., 1989) o distintas características fisiológicas o bioquímicas (Grondona y col., 1997). Actualmente, gracias al uso de técnicas de biología molecular, como estudios de RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) *DNA fingerprinting*, RAPDs (*random amplified polymorphism DNA-PCR*), marcadores SCAR (*sequence characterized*

Introducción

amplified region) y la secuenciación de regiones concretas del genoma como el ADNr, regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) o de algún fragmento del gen *tef1* (factor de elongación de la transcripción), los grupos taxonómicos están siendo mucho mejor definidos (Muthumeenakshi y col., 1994; Gams y Meyer, 1998; Lieckfeldt y col., 1998; Hermosa y col., 1999, 2000, 2004b; Kullnig-Gradinger y col., 2002; Rubio y col., 2005). En la actualidad, el género *Trichoderma* se compone de más de 100 especies (Druzhinina y col., 2006) de las cuales tres han sido secuenciadas y anotadas: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma reesei* (Martínez y col., 2008; Kubicek y col., 2011); y los genomas de otras cinco han sido secuenciados y están siendo analizados: *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *Trichoderma hamatum* y dos especies patógenas humanas: *T. longibrachiatum* y *Trichoderma citrinoviride* (Mukherjee y col., 2013; Studholme y col., 2013; Xie y col., 2014).

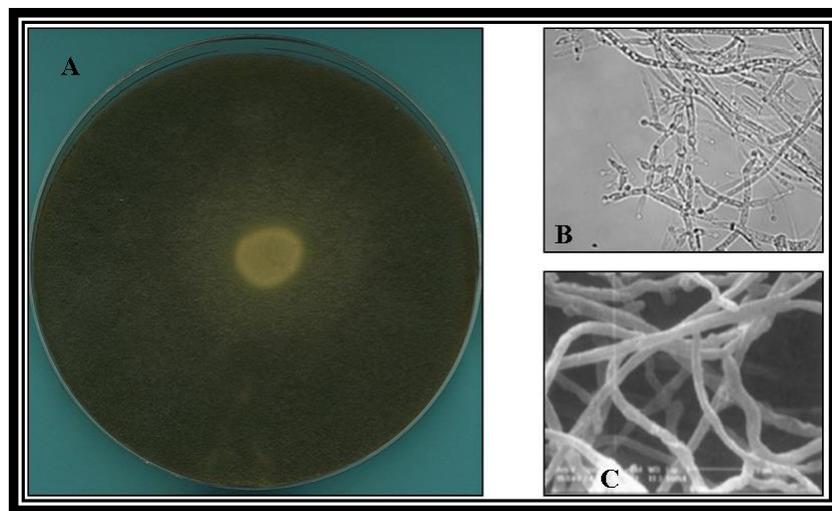


Figura 1. Colonia de *T. harzianum* T34 en medio PDA (A) y su apariencia al microscopio óptico (B) y electrónico de barrido (C).

1.2. APLICACIONES

Las especies de *Trichoderma* poseen características que las convierten en organismos con un gran interés industrial. La habilidad de *T. reesei* para degradar el material celulósico ha guiado su explotación comercial hacia áreas tan diversas como las fermentaciones alcohólicas, los detergentes para el lavado de ropa, el blanqueo del papel reciclado, la alimentación animal, o la producción de biocombustibles (Reese y Mandels, 1989; Kubicek y col., 1990; Schuster y Schomoll, 2010). Por otro lado, la capacidad secretora de *Trichoderma* lo presenta como una alternativa a los organismos empleados hoy en día para la producción de proteínas con fines farmacéuticos (Peterson y Nevalainen, 2012; Saloheimo y Pakula, 2012).

Recientemente se ha demostrado la habilidad de distintas especies de *Trichoderma* en el campo de la nanotecnología para la biosíntesis de nanopartículas de

plata y cobre (Devi y col., 2013; Salvadori y col., 2014) y en la biorremediación de ambientes terrestres y acuáticos contaminados con distintos compuestos tóxicos como pesticidas químicos, metales pesados, cianuro e hidrocarburos de petróleo (Tripathi y col., 2013; Balaji y col., 2014; Salvadori y col., 2014).

Una de las aplicaciones que más interés despierta este género de hongos es la utilización de diferentes especies de *Trichoderma* en control biológico de enfermedades de plantas producidas por otros hongos, bacterias, virus y nematodos (Benítez y col., 2004; Harman y col., 2004; Druzhinina y col., 2011). El control biológico se puede definir como el empleo de organismos distintos al hombre con capacidad para reducir la población del agente causante de una enfermedad o evitar sus efectos (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Estos organismos pueden ser patógenos hipovirulentos que compiten por el espacio y por los nutrientes, variedades de plantas más resistentes a la enfermedad o microorganismos antagonistas que interfieren con la supervivencia del patógeno o con sus mecanismos para provocar la enfermedad, como es el caso de *Trichoderma*. Además, la principal ventaja del uso de agentes de control biológico es que se evita que aparezcan resistencias entre la población de patógenos, hecho que ocurre con el empleo de agroquímicos. Los agentes de control biológico suelen ser microorganismos de la microbiota autóctona por lo que no producen un impacto negativo en el medio ambiente, al contrario que los agentes químicos.

Trichoderma se ha usado como modelo de estudio en la mayor parte de las investigaciones realizadas sobre el control biológico de enfermedades de origen fúngico, ya que se trata de un organismo ubicuo, fácil de aislar y cultivar, y existe una considerable cantidad de trabajos acerca de sus habilidades antagonistas y modos de interacción con sus presas y con las plantas. Numerosas especies clasificadas dentro de este género se han utilizado en experimentos de control biológico de hongos patógenos de plantas o en experimentos de control integrado que, en la mayoría de los casos, se basan en la combinación de agentes biológicos y químicos, reduciendo la dosis de estos últimos hasta niveles subletales, gracias al efecto sinérgico de la acción de ambos tipos de tratamientos (Chet e Inbar, 1994; Monte, 2001). Además, se ha demostrado cómo una bioformulación, que contiene varias especies de *Trichoderma*, suplementada con quitina, es capaz de reducir los efectos de patógenos como *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate así como de estimular su crecimiento (Solanki y col., 2011). Tampoco debe obviarse, el potencial de los genes y productos génicos de *Trichoderma* para el desarrollo de pesticidas biológicos (Lorito y col., 1994; Monte, 2001; Woo y col., 2006; Keswani y col., 2014).

T. harzianum, *Trichoderma viride*, *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens* son las especies más usadas en control biológico (Papavizas, 1985; Chet, 1987; Harman y col., 2010). Algunos de estos hongos, sólo o en combinación con otras especies del género, se vienen utilizando desde hace tiempo en preparaciones comerciales para el control

Introducción

de numerosas enfermedades de plantas producidas por hongos (Monte, 2001). Se estima que más del 60% de los biofungicidas registrados en el mundo están basados en *Trichoderma* (Verma y col., 2007). Precisamente, el primer registro comercial en España de cepas de *Trichoderma* como materia activa fungicida (TUSAL®) corresponde a una patente de la Universidad de Salamanca (Hermosa y col., 2004a).

También se han descrito especies de *Trichoderma* que estimulan el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas, lo que se traduce en un incremento de la superficie de absorción y de la productividad de los cultivos. La mejora del crecimiento de plantas inoculadas con *Trichoderma* se ha relacionado con su capacidad de solubilizar nutrientes y de optimizar el uso de fertilizantes nitrogenados por parte de la planta (Altomare y col., 1999; Harman y col., 2004; Shores y col., 2010; Harman, 2011).

Otra de las aplicaciones biotecnológicas de los genes de *Trichoderma* es la expresión heteróloga en plantas con el objetivo de dotarlas de características beneficiosas, como la resistencia a enfermedades o la tolerancia de estreses abióticos (Hermosa y col., 2012; Nicolás y col., 2014). Así, se ha comprobado que líneas transgénicas de tabaco y patata, que expresan un gen que codifica una endoquitinasa de *T. harzianum*, son alta o completamente resistentes a los patógenos de hoja *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*, y de suelo *R. solani* (Lorito y col., 1998). Esta expresión heteróloga también confiere una mayor resistencia a *Venturia inaequalis* en plantas de manzana (Bolar y col., 2001), a *Alternaria brassicicola* en plantas de brócoli (Mora y Earle, 2001) y a los patógenos *Phoma tracheiphila* y *B. cinerea* en limonero, donde además se ha comprobado que existe correlación entre esta expresión heteróloga y la sobreexpresión de genes relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de genes sensibles al ácido jasmónico (JA) y al etileno (ET) (Gentile y col., 2007; Distefano y col., 2008).

La tolerancia a estreses abióticos inducida en *Arabidopsis* tras la sobreexpresión de genes de choque térmico de la propia planta, conlleva una inhibición del crecimiento de la misma (Cazalè y col., 2009). Sin embargo, estas alteraciones en el desarrollo no se han observado tras la expresión heteróloga del gen *hsp70* de *T. harzianum*, que codifica una proteína de choque térmico, en *Arabidopsis*, capaz de inducir resistencia a altas temperaturas, alta salinidad y sequía (Montero-Barrientos y col., 2010). También se ha observado que la expresión en esta misma planta del gen *Thk1* de *T. harzianum*, que codifica una proteína involucrada en la actividad glucosidasa, aumenta la germinación y la tolerancia a estreses osmóticos y salinos (Hermosa y col., 2011), o que plantas transgénicas de tabaco, que expresan una glutatión transferasa de *T. virens*, mejoran la remediación y el potencial de degradación de compuestos xenobióticos (Dixit y col., 2011).

2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma*

Los mecanismos de acción de *Trichoderma* se pueden agrupar en dos categorías: el control biológico de hongos, oomicetos y nematodos (con mecanismos como la competición, el micoparasitismo y la antibiosis) y los efectos beneficiosos para las plantas (promoviendo su crecimiento, aumentando su capacidad de defensa o aliviando los efectos negativos de estreses abióticos). Estas estrategias no son excluyentes entre sí, y la importancia relativa de cada una de ellas aún no está bien establecida, aunque parece que depende de la cepa de *Trichoderma*, del patógeno diana, del tipo de planta y de las condiciones ambientales.

2.1. CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS, OOMICETOS Y NEMATODOS FITOPATÓGENOS

Hace poco más de 80 años que Weindling (1932) describió la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* (ahora *T. viride*) sobre *R. solani*. Desde entonces se han observado diferentes mecanismos, que se describen a continuación, por los cuales *Trichoderma* previene y protege a las plantas del ataque de organismos fitopatógenos. De hecho, algunas cepas de *Trichoderma* han sido registradas en España y la Unión Europea como productos fitosanitarios para su aplicación en agricultura por su probada eficacia en el control biológico de hongos fitopatógenos, su gran capacidad para sobrevivir en distintos ambientes y su estabilidad genética y fenotípica (Jiménez-Díaz y col., 2010).

2.1.1. COMPETICIÓN

Se entiende por competición el desigual comportamiento de dos o más organismos por un mismo requerimiento o recurso, de manera que la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad disponible para los demás. Estos requerimientos o recursos pueden ser nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz, etc. (Paulitz, 1990). La omnipresencia de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo (Hermosa y col., 2004b) es una prueba de que es un buen competidor por el espacio y por los recursos nutritivos. Aparece en casi todos los suelos y también en hábitats naturales que contienen grandes cantidades de materia orgánica, donde se comporta como un excelente descomponedor de material vegetal y fúngico. Además, muchas especies del género *Trichoderma* muestran una gran versatilidad metabólica que les permite crecer utilizando un amplio abanico de fuentes de nitrógeno y de carbono (Grondona y col., 1997). Por otra parte, la capacidad para colonizar la rizosfera de las plantas es un punto clave en este proceso ya que un agente de control biológico que no sea capaz de crecer en la rizosfera no podrá competir por el espacio y los nutrientes (Howell, 2003). Se ha descrito que *Trichoderma* es capaz de producir

sideróforos que le ayudan a sobrevivir y competir mejor en la rizosfera a concentraciones bajas de hierro (Mukherjee y col., 2012a). Además, se ha comprobado un aumento en la expresión de genes relacionados con la adquisición de nutrientes en *T. reesei* cuando está en contacto con *R. solani* (Atanasova y col., 2013).

A pesar de todo, es difícil determinar si la competición por sí sola es suficiente para que *Trichoderma* ejerza su acción antagonista o si, por el contrario, otros mecanismos como la antibiosis o el micoparasitismo preparan el escenario para que la competición se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman, 2006).

2.1.2. MICOPARASITISMO

El micoparasitismo se define como la relación que un organismo establece con un hongo huésped de manera que se beneficia de éste, normalmente obteniendo nutrientes, sin aportarle nada a cambio y en ocasiones causando su muerte. Cuando es así, se habla de micoparásitos necrotróficos, para diferenciarlos de los biotróficos, que mantienen su relación con células vivas durante periodos largos de tiempo. Gracias a un estudio comparativo de los tres genomas anotados de *Trichoderma*, hasta la fecha se sabe que el micoparasitismo es un rasgo hereditario y que algunas especies han dejado de tener esta capacidad tras la pérdida de genes responsables de este proceso (Kubicek y col., 2011).

El micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* conlleva una serie de eventos secuenciales. En primer lugar, *Trichoderma* localiza al patógeno a distancia, y comienza a crecer por tropismo hacia él (Chet y col., 1981; Lu y col., 2004). Esta detección a distancia se debe, al menos parcialmente, a la expresión secuencial de enzimas degradadoras de pared celular, que al ser liberadas por *Trichoderma* difunden y comienzan el ataque al hongo diana antes de que se haya producido contacto físico (Zeilinger y col., 1999; Viterbo y col., 2002; Seidl y col., 2009; Atanasova y col., 2013).

Una vez en contacto, *Trichoderma* puede enroscarse alrededor del hongo diana y formar estructuras especializadas tipo apresorio (Benhamou y Chet, 1997), con las que podrá penetrar posteriormente en el interior de las hifas de su huésped (Figura 2). Durante este proceso *Trichoderma* produce varias enzimas degradadoras de pared celular: quitinasas, glucanasas y proteasas (Viterbo y Horwitz, 2010) que constituyen el punto clave del micoparasitismo (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). Además, algunos antibióticos como los peptaiboles contribuyen de manera sinérgica al debilitamiento de la pared del hongo diana favoreciendo la penetración de apresorios en las hifas de éste (Schirmböck y col., 1994; Degenkolb y col., 2003; Mukherjee y col., 2012b). Finalmente, *Trichoderma* digiere el contenido intracelular del hongo. Esta fase va acompañada de algunos cambios morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del hospedador (Benhamou y Chet, 1997).

También se ha comprobado que los antibióticos de naturaleza peptaibólica son responsables de provocar la muerte celular en el hospedador (Shi y col., 2012). En algunos casos, se ha observado esporulación de *Trichoderma* tras la completa digestión del hongo atacado e incluso la colonización y destrucción de estructuras más resistentes, como los esclerocios de hongos fitopatógenos (Elad y col., 1983).

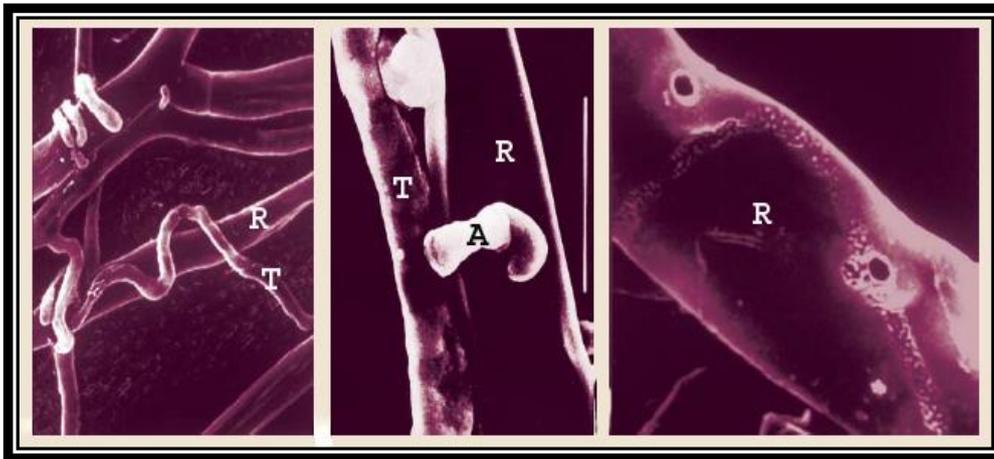


Figura 2. *Trichoderma* parasitando al hongo *R. solani*. En la foto de la izquierda, *Trichoderma* parasita una hifa de *R. solani*; se observa una reacción de enroscamiento típico de esta interacción. La foto del centro muestra una ampliación de la interacción *Trichoderma-Rhizoctonia* en la que pueden observarse las estructuras tipo apresorio. La barra equivale a 10 μ m. En la foto de la derecha, la hifa de *R. solani* de la que se ha retirado la hifa de *Trichoderma* muestra los poros provocados por el micoparásito en algunos puntos de unión entre ambas hifas. R, hifa de *R. solani*. T, hifas de *Trichoderma* sp. A, estructuras de tipo apresorio (tomado de Harman y col., 2004).

Como ya se ha mencionado, el mecanismo micoparasítico de *Trichoderma* implica la acción de diversas enzimas, entre las que se encuentran expansinas (Reithner y col., 2011), y distintas hidrolasas de pared celular (Viterbo y Horwitz, 2010). Debido a que la quitina y el β -1,3-glucano son los principales componentes estructurales de las paredes celulares de hongos [excepto en el caso de los oomicetos (Bartnicki-García, 1968) que han dejado de estar clasificados como hongos para formar parte de los cromistas], se ha propuesto que las quitinasas y las β -1,3-glucanasas son las enzimas claves en este proceso (Elad y col., 1982; Papavizas, 1985; de la Cruz y col., 1992). Sin embargo, se ha visto que las proteasas y otras enzimas que hidrolizan componentes minoritarios de las paredes fúngicas (β -1,6-glucanos o α -1,3-glucanos) también están implicadas en el micoparasitismo (Djonović y col., 2006; Montero y col., 2007; Monteiro y col., 2010).

2.1.3. ANTIBIOSIS

La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por el producto metabólico de otro, sin que medie contacto físico entre ellos. Muchas cepas de *Trichoderma* liberan metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles (Cardoza y col., 2005; Reino y col., 2008), que producen este efecto, además de actuar como

Introducción

moléculas señalizadoras en el diálogo con la planta (Vinale y col., 2006, 2008a; Malmierca y col., 2014b). La actividad antibiótica de *Trichoderma* la detectó Weindling (1932) por primera vez y desde entonces se han descrito numerosos antibióticos producidos por las especies de este género.

La producción de metabolitos secundarios, compuestos que parecen no tener un papel vital en el metabolismo de los organismos que los producen, es dependiente de la cepa y de las condiciones ambientales, que determinan qué moléculas se sintetizarán y en qué cantidad (Hermosa y col., 2014). Por otra parte, el papel de estos compuestos en el antagonismo es fundamental, y los mecanismos antagonistas que despliega *Trichoderma* no son independientes, sino que interactúan unos con otros (Jeger y col., 2009). Un ejemplo de acción sinérgica se ha observado en el efecto antifúngico frente a hongos fitopatógenos de los géneros *Botrytis*, *Fusarium* o *Alternaria*, que se incrementa tras una aplicación conjunta de antibióticos y enzimas hidrolíticas de *Trichoderma* (Schirmböck y col., 1994; Lorito y col., 1996).

Los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* se clasifican en diferentes grupos según su origen biosintético y su estructura química. De manera general, en base a las estructuras de los diferentes metabolitos con actividad antibiótica identificados hasta ahora en *Trichoderma* se pueden distinguir dos grupos principales:

I. Metabolitos de bajo peso molecular (< 3000 Daltons) y volátiles: este grupo incluye compuestos aromáticos sencillos, algunos poliquétidos como pironas y butenólidos, terpenos volátiles y de tipo isociano, y sustancias relativamente no polares que tienen una presión de vapor significativa. En el ambiente del suelo, estos compuestos orgánicos volátiles podrían recorrer distancias a través del sistema edáfico y la rizosfera, y mejorar la condición de un organismo al modificar la fisiología de otros organismos competidores, como sucede con la 6-pentil- α -pirona (6PP) (Vinale y col., 2008a; Rubio y col., 2009).

II. Metabolitos de alto peso molecular y polares: este grupo incluye peptaiboles que pueden exhibir su actividad en interacción directa por contacto entre especies de *Trichoderma* y sus antagonistas (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Shi y col., 2012).

Entre los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana más representativos del género *Trichoderma* están los poliquétidos y los terpenos (Cardoza y col., 2005; Reino y col., 2008; Mukherjee y col., 2012a; Shi y col., 2012). Dentro de estos últimos se incluyen los trichotecenos como la trichodermina, aislada de *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma sporulosum* y *Trichoderma brevicompactum*, y el harzianum A, aislado de *Trichoderma arundinaceum* ampliamente estudiado

(Tijerino y col., 2011a, 2011b; Malmierca y col., 2012, 2014a, 2014b), ambos con actividad antifúngica. Recientemente, el desarrollo de la genómica y la proteómica ha permitido identificar algunos genes y los *clusters* biosintéticos de estos compuestos, (Lorito y col., 2010; Cardoza y col., 2011). Sin embargo, a pesar de la importancia toxicológica y biotecnológica y de sus características antibióticas y citotóxicas, el registro de estos metabolitos necesita ser analizado con cautela.

2.2. RELACIÓN CON LAS PLANTAS

Algunas cepas de *Trichoderma* han mostrado efectos directos en las plantas: aumentando su potencial de crecimiento, la absorción de nutrientes, la eficiencia en el uso de fertilizantes, el porcentaje y velocidad de germinación de las semillas, y la estimulación de sus defensas frente a daños bióticos y abióticos (Shoresh y col., 2010). Aunque algunas especies del género han evolucionado como endofitas en raíces (Druzhinina y col., 2011), no todas las cepas son aptas para colonizar la planta e inducir una respuesta defensiva en la misma (Howell, 2003). Aquellas que lo son, germinan y colonizan la superficie de las raíces llegando a penetrar en las primeras capas de células del córtex vegetal (Yedidia y col., 1999; Harman y col., 2004; Woo y col., 2006). Se ha confirmado cómo se fortalece la epidermis y las paredes corticales celulares de la planta por el depósito de infiltraciones de celulosa y de calosa (Chacón y col., 2007), incluso más allá del sitio de penetración del hongo, impidiendo su entrada en el tejido vascular (Yedidia y col., 1999). Recientemente, se ha observado que mutantes de *Arabidopsis* deficientes en el gen que codifica la isocorismato sintasa, enzima implicada en la síntesis de ácido salicílico (SA), son susceptibles de ser colonizados por *T. harzianum* llegando incluso a pasar del apoplasto a los haces vasculares de la raíz (Alonso-Ramírez y col., 2014).

La rizosfera es el nicho ecológico común para *Trichoderma* y le da la oportunidad de comportarse como biótrofo y saprófito (Druzhinina y col., 2011). La afinidad por la rizosfera se puede explicar por dos preferencias nutricionales. La primera es que la mayoría de las raíces son colonizadas por hongos micorrícicos (Martínez y col., 2003) o bacterias saprofíticas (Vrany y col., 1990) que son presas potenciales para *Trichoderma*. La segunda, es que las raíces de las plantas, en especial sus ápices, están recubiertas de una capa gelatinosa denominada mucigel, que contiene polisacáridos altamente hidratados, pectina y hemicelulosa, que es altamente degradable por *Trichoderma*. Se ha comprobado que una endopoligalacturonasa de *T. harzianum* es necesaria para que este hongo se establezca con éxito en la rizosfera de tomate (Morán-Diez y col., 2009). Además, se ha demostrado que la sacarosa secretada por las raíces de las plantas juega un papel importante como fuente de carbono para *T. virens*, facilitando la colonización de la raíz, coordinando los mecanismos de defensa y aumentando la capacidad fotosintética de las hojas (Vargas y

col., 2009). Debido a las permeasas que tiene el hongo éste es capaz de transportar sacarosa al interior de las hifas y asimilarla gracias a una invertasa intracelular. De hecho, se ha estudiado un transportador de sacarosa específico que se induce en *Trichoderma* durante los estadios tempranos de la colonización de raíz (Vargas y col., 2011).

La adherencia de *Trichoderma* a las raíces de las plantas está mediada por varias proteínas de la pared celular fúngica, como son por ejemplo las hidrofobinas (Kubicek y col., 2008). El contacto también conlleva la activación de los mecanismos de defensa de la planta (Viterbo y Chet, 2006). Se ha descrito una proteína en *Trichoderma*, denominada eswolenina, que contribuye a la colonización de las raíces de pepino por parte del hongo y que además es capaz de inducir una respuesta de defensa local frente a *B. cinerea* y *Pseudomonas syringae* (Brotman y col., 2008).

2.2.1. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO

En los últimos años se ha documentado la capacidad de *Trichoderma* para estimular el crecimiento y desarrollo de las raíces de las plantas, lo que se traduce en un incremento en la productividad de los cultivos (Harman y col., 2004; Harman, 2011). Para explicar este hecho, se han sugerido varios mecanismos, como son la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores o la conversión de material no utilizable en formas que puedan ser asimiladas por las plantas. Por ejemplo, *Trichoderma* posee la capacidad de solubilizar metales como el zinc, el manganeso, el hierro o el cobre, convirtiéndolos en nutrientes asimilables por las plantas (Altomare y col., 1999; Benítez y col., 2004; Harman y col., 2004; Vinale y col., 2013). También se ha descrito que la proteína QID74 en este hongo, ligada a la pared celular de las hifas, es capaz de modificar la arquitectura de la raíz aumentando su superficie de absorción de nutrientes por medio del incremento del número y longitud de los pelos radicales en las raíces secundarias (Samolski y col., 2012).

Se sabe que el tratamiento con *T. harzianum* de plantas de maíz crecidas en suelos pobres en nitrógeno, causa cambios fisiológicos en las mismas; así, éstas son mayores y más verdes al principio de la fase de crecimiento, y luego adquieren un mayor diámetro de tallo, que proporciona mejores rendimientos de grano (Harman, 2000). También ciertos metabolitos con actividad antifúngica pueden tener un efecto beneficioso en la promoción del crecimiento de las plantas, como es el caso de bajas concentraciones del ácido harziánico producido por *T. harzianum* (Vinale y col., 2009).

Existen estudios que demuestran que algunas cepas de *Trichoderma* pueden regular los niveles de auxina (ácido indolacético, IAA) en la rizosfera, una hormona que promueve el crecimiento de las raíces laterales de las plantas y, por extensión, proteger el sistema radical e inducir defensa sistémica frente al ataque de patógenos

(Björkman, 2004). Por ejemplo, *T. virens* incrementa la biomasa de la raíz y aumenta el crecimiento de las raíces laterales en *Arabidopsis*, probablemente por mecanismos mediados por IAA (Contreras-Cornejo y col., 2009, 2014).

Sin embargo, la promoción del crecimiento de las plantas provocada por *Trichoderma* también podría deberse a una disminución en los niveles de ET, mediada por la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. Esta enzima degrada el ACC, que es un precursor de ET, y se ha comprobado que se expresa durante la interacción de *T. atroviride* con plantas de tomate (Gravel y col., 2007), y de *T. asperellum* con raíces de colza (Viterbo y col., 2010).

2.2.2. RESPUESTA DE DEFENSA

Las plantas están obligadas a discriminar entre los diferentes retos que les plantea su entorno y responder ante ellos. Este es el caso de los miles de microorganismos que conviven con ellas, que pueden ser tanto perjudiciales como beneficiosos. Es por ello que plantas y microorganismos han coevolucionado hasta crear un diálogo complejo y dinámico con respuestas de ataque y defensa.

Las plantas poseen dos grandes tipos de defensa (Figura 3). La primera de ellas es la defensa preformada o constitutiva, que supone una barrera inicial de protección. Esta defensa puede ser de tipo estructural (presencia de capas gruesas de cutícula, más cantidad y calidad de ceras en la superficie de las hojas y frutos, etc.) o química (presencia y secreción de glucósidos, saponinas, alcaloides, etc.).

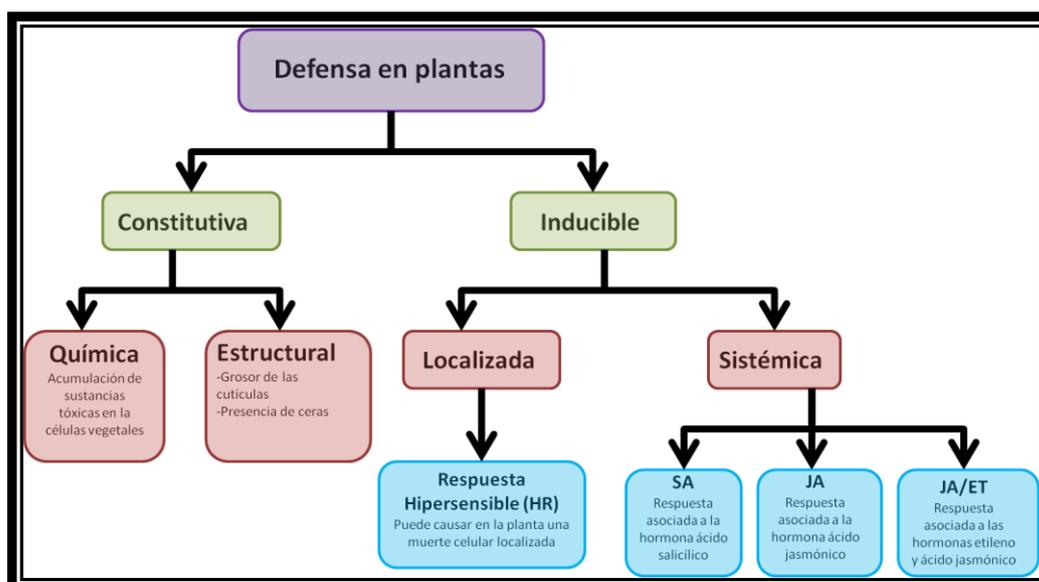


Figura 3. Esquema de la respuesta defensiva en plantas.

Para convertirse en patógenos, muchos microorganismos tienen que superar esta barrera de defensa constitutiva y para ello pueden acceder al interior de la planta

Introducción

a través de la superficie de la hoja o de la raíz, directamente, por heridas o por aperturas naturales como los estomas. Una vez dentro de la planta, se encuentran con la pared celular, rígida y celulósica, que rodea a cada célula. Su penetración expone al patógeno a las defensas inducibles, constituidas en primer lugar por receptores embebidos en la membrana citoplasmática, conocidos como receptores PRR (*pattern recognition receptors*), que reconocen los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* o PAMPs) (Chisholm y col., 2006). La percepción de los PAMPs por los PRRs es común a todos los organismos multicelulares y conduce a una serie de reacciones de defensa y redistribución de la energía celular para prevenir nuevos ingresos de patógenos (Nicaise y col., 2009). Los PAMPs están muy conservados entre diferentes tipos de microorganismos como bacterias (lipopolisacárido, flagelina o factor de elongación de la transcripción EF-tu), hongos (quitina o ergosterol) u oomicetos (β -glucanos). Los receptores PRR también son capaces de reconocer DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), que son moléculas liberadas por la acción hidrolítica de los microorganismos, como es el caso de oligogalacturónidos, fragmentos formados al romperse el homogalacturonano de la matriz extracelular de la planta herida o por la acción de las endopoligalacturonasas de un microorganismo. La unión de PAMPs o DAMPs con los PRRs induce una respuesta de defensa basal e inespecífica (Bruce y Pickett, 2007), conocida como inmunidad provocada por patógenos (*PAMP-triggered immunity* o PTI), en la que se fosforilan cascadas de proteínas quinasas que conducen a la activación de factores de transcripción tipo WRKY reguladores de la respuesta de defensa (Pandey y Somssich, 2009), a la vez que se produce una rápida alcalinización del medio, se estimula la apertura de canales de iones, se produce un estallido oxidativo y nitrosativo (Mur y col., 2013a), y cambios en el estado redox celular, un reforzamiento de la pared en forma de producción de lignina y acumulación de depósitos de calosa entre la pared celular y la membrana citoplasmática, y el cierre de estomas. La PTI induce la producción de SA, requerido para activar la defensa local y sistémica, y la producción de ET y la acumulación transitoria de JA endógeno, como fitohormonas señaladoras primarias en la regulación de la respuesta inmune de las plantas (Pieterse y col., 2009). Normalmente, la PTI es suficiente para mantener al patógeno controlado, aunque su inicio lento la hace vulnerable al ataque de patógenos adaptados (Katagiri y Tsuda, 2010). Los patógenos han evolucionado para suprimir la PTI, bien interfiriendo su reconocimiento por los receptores PRR o bien secretando moléculas efectoras (proteínas Avr, coronatina, giberelinas, etc.) al citoplasma de la célula vegetal por medio de un sistema de secreción de tipo III (bacterias), haustorios (hongos y oomicetos) o estilestes (áfidos y nematodos), que alteran la señalización o la manifestación de las respuestas de defensa PTI (Dodds y Rathjen, 2010). Interesantemente, la capacidad para liberar moléculas efectoras de forma directa en el citoplasma de las células hospedadoras para suprimir la PTI es una característica integradora de los organismos fitopatógenos pero a la vez específica para cada uno de

ellos, ya que un patógeno puede producir hasta 20-30 moléculas efectoras diferentes (Hammond-Kosack y Parker, 2003). El aumento de la susceptibilidad de la planta a los patógenos debida a la supresión de la PTI por estas moléculas se conoce como *effector-triggered susceptibility* (ETS) (Jones y Dangl, 2006).

Las plantas han evolucionado, a su vez, desarrollando un tipo de receptores citoplasmáticos capaces de contrarrestar a las moléculas efectoras, entre ellos los más abundantes son un tipo de receptores muy polimórficos que contienen un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio con repeticiones ricas en leucina (LRR). Efectores de organismos pertenecientes a distintos reinos son reconocidos por los receptores NBS-LRR y, como resultado se produce una inmunidad provocada por efectores (*effector-triggered immunity* o ETI) que normalmente resulta en una respuesta hipersensible (HR) en los sitios de inoculación y proporciona una resistencia local efectiva frente a patógenos con estilo de vida biotrófico y hemibiotrófico (Jones y Dangl, 2006). También se ha descrito que el péptido bacteriano flg22 y la flagelina inducen HR (Naito y col., 2008), revocando la creencia de que los PAMPS generalmente no inducen esta respuesta.

Debido a los múltiples efectores que tiene un microorganismo se pueden activar y reprimir, una y otra vez, sucesivas respuestas ETI, estableciéndose un modelo que funciona en forma de zig-zag (Jones y Dangl, 2006) (Figura 4). Aunque la ETI se asocia a respuestas locales más intensas que la PTI, las redes de señalización de ambos tipos de defensa se solapan parcialmente, dando lugar al reforzamiento de la pared, ya referido; a la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos, como las fitoalexinas; y a la acumulación de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), tales como quitinasas, glucanasas e inhibidores de proteasas, capaces de degradar la pared de hongos y oomicetos, o interferir en su plan de ataque. Es, por tanto, cuestionable que PTI y ETI sean respuestas de defensa diferentes, siendo PTI la variante débil de la ETI. Más bien parece que PTI y ETI generan respuestas fuertes o débiles dependiendo de su interacción específica, y que distintas moléculas (PAMPs, DAMPs o efectores) activan distintas rutas de señalización de defensa, dependiendo de la propia molécula elicitora, del tipo de receptor y posiblemente de las condiciones ambientales prevalentes en cada situación (Thomma y col., 2011).

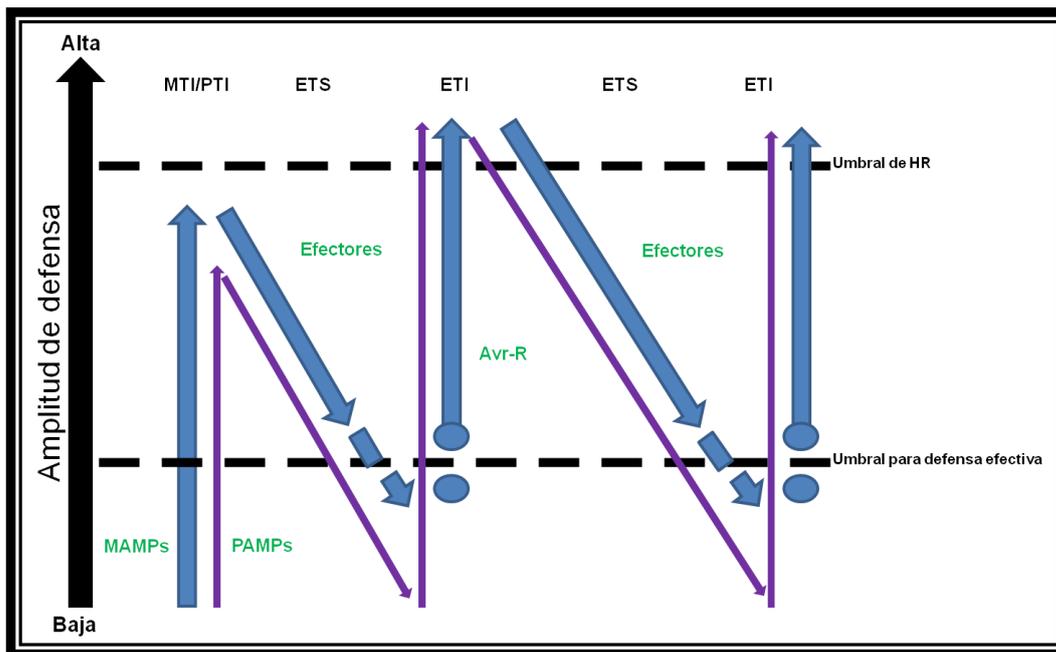


Figura 4. Cambios en la amplitud de defensa de las plantas en respuesta a patógenos o cepas de *Trichoderma* siguiendo el modelo de zig-zag propuesto por Jones y Dangl (2006). Las flechas azules indican la respuesta defensiva de la planta en presencia de *Trichoderma* mientras que las flechas moradas corresponden a la respuesta defensiva de la planta en presencia de un patógeno. MAMPs son patrones moleculares asociados a microbio; PAMPs son patrones moleculares asociados a patógeno; MTI/PTI es la inmunidad provocada por MAMPs o por PAMPs, respectivamente; ETS es la susceptibilidad provocada por efectores del microorganismo; ETI es la inmunidad provocada por dichos efectores; HR es la respuesta hipersensible. Avr-R es la interacción específica entre un gen efector Avr del microorganismo y un gen de resistencia de la planta (tomado de Lorito y col., 2010, con ciertas modificaciones).

Los microorganismos beneficiosos, como las bacterias de la rizosfera promotoras del crecimiento (PGPR), micorrizas o *Trichoderma*, también son capaces de activar la respuesta defensiva en las plantas. En este caso, al tratarse de no patógenos, sus firmas señaladoras se denominan patrones moleculares asociados a microbio (*microbial-associated molecular patterns* o MAMPs), que al igual que los PAMPs están muy conservados. En *Trichoderma* se ha identificado una amplia variedad de MAMPs (Hermosa y col., 2012): xilanasas (Rotblat y col., 2002), celulasas (Martínez y col., 2001), ceratoplataninas (Djonović y col., 2006; Seidl y col., 2006) o incluso metabolitos secundarios que a bajas dosis pueden actuar como MAMPs, como pueden ser las 6PP, la harzianolida o la harzianopiridona (Vinale y col., 2008a). Además, *Trichoderma* también es capaz de producir DAMPs, por la acción de determinadas enzimas hidrolíticas del hongo, como sucede con la endopoligalacturonasa ThPG1 aislada de *T. harzianum* (Morán-Díez y col., 2009) o con distintas celulasas (Martínez y col., 2001). De esta manera, se activaría un tipo de inmunidad, similar a la PTI, denominada *MAMP-triggered immunity* (MTI) que parece ser más fuerte que la provocada por los patógenos (MTI>PTI), gracias a la producción de esa gran variedad de MAMPs, algo no

tan común a otros microorganismos (Lorito y col., 2010), capaces de unirse a receptores PRR. Hasta hoy sólo se ha podido identificar una asociación MAMP-PRR en *Trichoderma*: la xilanasas EIX de *T. viride* (Rotblat y col., 2002) y su correspondiente receptor LeEix2 (Ron y Avni, 2004). No obstante, los genomas de *Trichoderma* contienen muchas proteínas de unión a quitina con dominios de lisina (LysM) (Kubicek y col., 2011) capaces de suprimir la defensa basal (PTI) de la planta secuestrando quitooligosacáridos susceptibles de ser reconocidos por receptores PRR como el LysM-CERK1 (de Jonge y col., 2010).

Como se indicó anteriormente, la respuesta MTI/PTI desencadena varios procesos, entre ellos la producción de fitoalexinas y compuestos fenólicos, pero se sabe que *Trichoderma* es capaz de suprimir la producción de fitoalexinas (Masunaka y col., 2011) o degradar los compuestos fenólicos exudados por las plantas (Chen y col., 2011). De una manera similar a lo que ocurre con los patógenos, *Trichoderma* es capaz de producir efectores, algunos de los cuales pueden ser los propios MAMPs (Hermosa y col., 2012, 2013), causando una respuesta ETI más robusta que la provocada por los patógenos, ya que produce en la planta una reacción más rápida e intensa (*priming*), o la activa mediante la liberación en el citoplasma de la planta de efectores que pueden ser específicamente reconocidos por receptores NBS-LRR. En este sentido, se han identificado en *T. harzianum* y *T. atroviride* proteínas homólogas a las proteínas efectoras Avr4 y Avr9 de *Cladosporium fulvum* (Harman y col., 2004), y se han descrito receptores NBS-LRR en plantas de judía en interacción con *T. atroviride* y en plantas de maíz en interacción con *T. harzianum* (Marra y col., 2006; Shores y Harman, 2008). También se ha comprobado cómo el trichoteceno harzianum A de *T. arundinaceum* puede activar una respuesta defensiva frente a *B. cinerea* en plantas de tomate (Malmierca y col., 2012; 2014b). Tomando todos estos datos en conjunto, parece que *Trichoderma* también es capaz de provocar respuestas de defensa que cumplen el modelo zig-zag (Lorito y col., 2010) indicado anteriormente (Figura 4). Sin embargo, se necesitan estudios más concretos que identifiquen tanto los elicitores (MAMPs y efectores) de *Trichoderma* como sus correspondientes receptores en las plantas para poder generalizar esta hipótesis.

Una vez que se ha producido una interacción específica, PTI/MTI o ETI, se desencadena toda una batería de respuestas por parte de la planta en la que participan distintas fitohormonas: SA, JA o ET. La respuesta mediada por JA y JA/ET se conoce como resistencia sistémica inducida (ISR) mientras que la respuesta mediada por SA se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR). Los términos ISR y SAR se han utilizado en los últimos años para definir los modelos de rutas de señalización hormonal que marcan las defensas de las plantas frente a patógenos, insectos y heridas, siendo la respuesta SAR desencadenada por patógenos biotrofos y la ISR

Introducción

activada por heridas, insectos, rizobacterias, hongos beneficiosos y patógenos necrotrofos.

Son varios los estudios que proponen una similitud entre la ISR por rizobacterias (van Loon y Bakker, 2005; Yang y col., 2009) y la respuesta desencadenada por *Trichoderma* (Shoresh y col., 2005; Alfano y col., 2007; Segarra y col., 2009). Precisamente, como otros microorganismos que no son patógenos, *Trichoderma* activa ISR, la cual culmina en la acumulación de componentes asociados a las rutas del JA y del ET como son la fenilalanina amonio liasa, la hidroperóxido liasa y la peroxidasa (Shoresh y col., 2010).

No obstante, también se han descrito respuestas de tipo SAR desencadenadas por *T. virens* (Howell, 2003), *T. harzianum* (Morán-Diez y col., 2009) y *T. longibrachiatum* (Martínez y col., 2001), y se ha comprobado cómo en estadíos tempranos de la interacción de *T. asperellum* con plantas de pepino se activa SAR cuando se inocula el hongo en altas concentraciones (Segarra y col., 2007).

La línea que separa ambas respuestas no está claramente delimitada y actualmente se acepta mejor la existencia de un diálogo entre ambas rutas. Pieterse y col. (2009) revisaron cómo las respuestas de defensa frente a microorganismos también están relacionadas con las respuestas de la planta frente a estreses ambientales, formando una red interconectada de señalización hormonal en la que giberelinas, IAA y ácido abscísico (ABA) también desempeñan un papel protagonista.

Se ha confirmado que las plantas tratadas previamente con *Trichoderma* son capaces de desencadenar la respuesta SAR durante largo tiempo, mediante la sobrerregulación de genes marcadores de SA en la planta. Sin embargo, si esas mismas plantas son infectadas más tarde con el patógeno *B. cinerea* se produce una disminución en la expresión de esos mismos genes, dando lugar a la inducción de genes de la ruta del JA, desencadenando finalmente una respuesta ISR que se incrementa con el tiempo (Tucci y col., 2011; Malmierca y col., 2014b).

El diálogo entre *Trichoderma* y la planta es un proceso dinámico y la expresión de genes relacionados con las rutas de señalización de defensa por JA/ET y/o SA se puede solapar en función de la cepa de *Trichoderma*, la concentración a la que se aplique, el tipo de material vegetal, el estadio de desarrollo de la planta y el momento y duración de la interacción (Hermosa y col., 2012).

2.2.3. RESISTENCIA A ESTRESSES AMBIENTALES

Trichoderma es capaz de aumentar la resistencia de las plantas a estreses abióticos, aunque los mecanismos mediante los cuales ejerce este efecto todavía no se conocen (Hermosa y col., 2012). Así, se ha visto cómo plantas de maíz son más

resistentes a la deficiencia de agua cuando están inoculadas con *T. harzianum* (Donoso y col., 2008) y cómo hay un retraso en la aparición de los síntomas provocados por la sequía en plantas de cacao en asociación con *T. hamatum* (Bae y col., 2009). También, se ha comprobado que semillas de tomate tratadas con *T. harzianum* están más protegidas frente a un estrés osmótico, salino y térmico (Mastouri y col., 2010). Por otro lado, un estudio transcriptómico mediante *microarrays* ha puesto de manifiesto la inducción de genes relacionados con estrés abiótico en *Arabidopsis* tras su interacción con *T. harzianum* (Morán-Diez y col., 2012).

3. ÓMICAS

En los últimos años el desarrollo de la biología molecular y celular ha motivado el perfeccionamiento y desarrollo de nuevas técnicas biológicas y bioinformáticas. Los avances logrados en estas áreas han abierto la puerta a una nueva mentalidad en la que se desarrolla una visión global de los procesos biológicos. Este concepto de globalización, se ve reflejado en el desarrollo de lo que se ha denominado como “La era Ómica”.

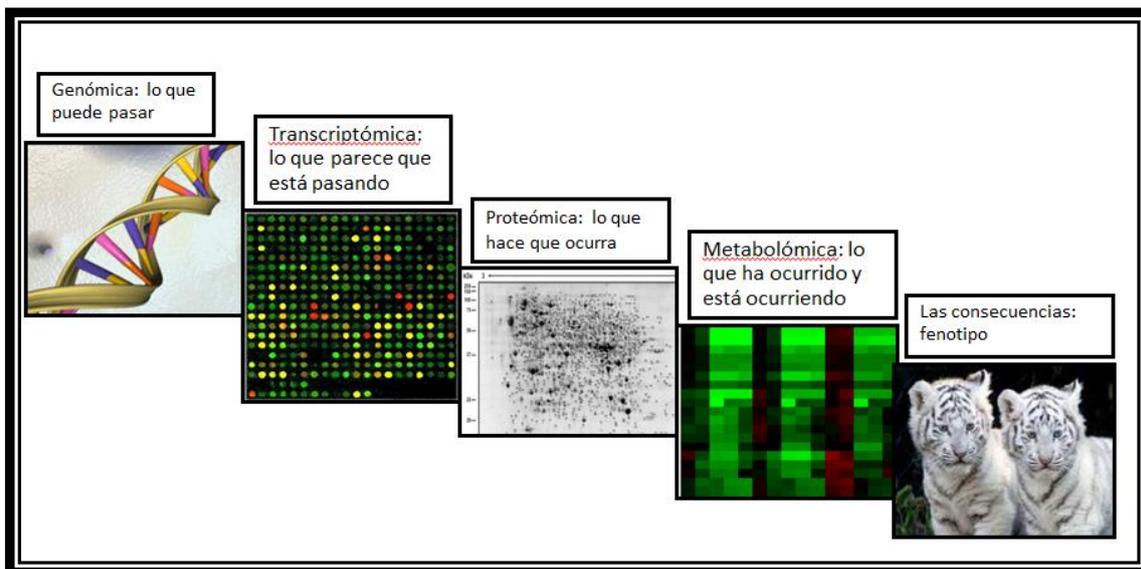


Figura 5. Esquema de las distintas disciplinas que forman las “ómicas”.

El término “ómicas” hace referencia a varias disciplinas, como la genómica, la proteómica, la transcriptómica o la metabolómica (Figura 5). A las tres últimas también se las agrupa bajo la denominación de “genómica funcional”, ya que estudian los productos de la expresión de los genes. Todas las “ómicas” se basan en el análisis de un gran volumen de datos, y por lo tanto se valen de la bioinformática y de técnicas rápidas y automatizadas de alto rendimiento.

3.1. GENÓMICA

La genómica se puede definir como el conjunto de disciplinas relacionadas con el estudio de los genomas (del conjunto de genes y organización génica de un organismo) y sus aplicaciones.

Respecto a *Trichoderma*, un proyecto de genómica realizado por el *Joint Genome Institute* (JGI, dependiente del Departamento de Energía de los EE.UU.) proporcionó la secuencia completa del genoma de *T. reesei*. Toda la información relacionada con los 9.143 genes de este trabajo se encuentra en la página web: <http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html> (Martínez y col., 2008).

En 2011 se ensamblaron completamente los genomas de dos cepas correspondiente a dos especies muy usadas en biocontrol como son *T. virens* y *T. atroviride*. Toda la información relacionada con estos trabajos se encuentra en las páginas web: http://genome.jgi-psf.org/TriviGv29_8_2/TriviGv29_8_2.home.html y <http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>, respectivamente (Kubicek y col., 2011).

La comparación de estos tres genomas ha evidenciado que comparten entre el 78 y el 96% de los genes. Además, un análisis filogenético demostró que tanto *T. reesei* como *T. virens* son derivados de *T. atroviride*, que su función ancestral fue la micotrofia (Druzhinina y col., 2011), y que evolucionaron hasta convertirse en micoparásitos. Sin embargo, *T. reesei* ya no tiene esa capacidad ya que ha perdido los genes específicos para ello (Kubicek y col., 2011).

Durante la escritura de esta Tesis Doctoral se ha anunciado la finalización de los procesos de secuenciación de los genomas de las especies *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum* y *T. hamatum* (Mukherjee y col., 2013; Studholme y col., 2013; Xie y col., 2014). Sin embargo, la anotación de estos genomas y los posteriores estudios comparativos con los ya publicados, todavía llevará un tiempo.

3.2. TRANSCRIPTÓMICA

La transcriptómica estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de ARN mensajeros (ARNm) o transcritos presentes en una célula, tejido u organismo. Los transcriptomas son muy variables, ya que muestran qué genes se están expresando bajo una determinada condición en un momento dado.

Se han seguido diferentes estrategias para el estudio del transcriptoma, como métodos basados en ESTs (*expressed sequence tags*), la búsqueda de grupos

específicos de genes (como por ejemplo quitinasas, peptidasas, hidrofobinas, etc.), la hibridación sustractiva supresiva (SSH), o los *arrays*.

3.2.1. ESTs

El primer trabajo realizado exclusivamente mediante un análisis de ESTs en *Trichoderma* se centró en el estudio de las rutas de secreción y procesamiento de proteínas en *T. reesei* QM6a (Diener y col., 2004). Se secuenciaron 21.888 ESTs a partir de dos genotecas diferentes de ADN complementario (ADNc), que correspondieron a 7.943 transcritos únicos.

Liu y Yang (2005) secuenciaron 3.298 ESTs, a partir de una única genoteca de *T. harzianum*, de una cepa no especificada, que correspondieron a 1.740 transcritos únicos; e identificaron distintos genes potencialmente implicados en control biológico.

En el año 2002 comenzó el proyecto de genómica funcional *TrichoEST*, con el objetivo de identificar genes y productos génicos de *Trichoderma* spp. con alto valor biotecnológico. Se construyeron 28 genotecas de ADNc, utilizando poblaciones de ARNm obtenidas bajo condiciones que simulaban procesos de biocontrol, estreses nutritivos e interacción con plantas, a partir de 12 cepas pertenecientes a ocho especies diferentes de *Trichoderma* (Rey y col., 2004). Se secuenciaron más de 25.000 ESTs y un análisis *in silico* de las mismas reveló 13.814 transcritos únicos, 8.710 de los cuales provinieron de genotecas de ADNc de *T. harzianum* (Vizcaíno y col., 2006b). Así, en esta especie se identificaron varios genes entre los que destacan varios que codifican proteasas (Suárez y col., 2005), un transportador de oligopéptidos (Vizcaíno y col., 2006a), un gen que codifica la endopoligalacturonasa ThPG1 (Morán-Diez y col., 2009); otro que codifica una cutinasa, probablemente involucrada en la interacción con la planta (Rubio y col., 2008), genes involucrados en la biosíntesis de terpenos (Cardoza y col., 2007), un factor de transcripción relacionado con la producción de 6PP (Rubio y col., 2009), un gen que codifica una proteína activadora de mitógenos (MAPK) involucrada en la respuesta al estrés hiperosmótico (Delgado-Jarana y col., 2006), y un gen que codifica una proteína de choque térmico HSP70 relacionada con la resistencia al estrés térmico, oxidativo, osmótico y salino (Montero-Barrientos y col., 2008), que confiere tolerancia a estreses abióticos cuando se transfiere a *Arabidopsis* (Montero-Barrientos y col., 2010).

3.2.2. BÚSQUEDA DE GRUPOS ESPECÍFICOS DE GENES

La búsqueda de grupos específicos de genes de *Trichoderma* ha permitido estudiar mejor en este género la función biológica de las proteínas que codifican, y su relación con el medio ambiente, con otros microorganismos, patógenos y no patógenos, y con la planta.

Seidl y col. (2005) identificaron 18 fases de lectura abierta (ORFs) que codificaban quitinasas hipotéticas de *T. reesei*, utilizando la base de datos disponible del genoma de esta especie, y las clasificaron en tres grupos filogenéticos. Algunas de ellas aumentaron su expresión en presencia del hongo fitopatógeno *R. solani*, sugiriendo una posible implicación de las mismas en los mecanismos de biocontrol de *Trichoderma*.

Siguiendo una aproximación parecida, Suárez y col. (2007) describieron 11 nuevas peptidasas en *T. harzianum* T34 a partir del proyecto *TrichoEST*.

Kubicek y col. (2008) estudiaron los mecanismos de evolución de las hidrofobinas de tipo II en nueve especies de *Trichoderma*, usando los genomas disponibles de *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens*, y 14.000 ESTs de otras seis especies de *Trichoderma* distintas. Comprobaron que estas proteínas son muy abundantes en el género y están relacionadas con la habilidad de este hongo para unirse a un amplio rango de hospedadores fúngicos y de plantas.

3.2.3. SSH: SUSTRACCIÓN BASADA EN PCR E HIBRIDACIÓN SUBSTRACTIVA RÁPIDA (RaSH)

La sustracción basada en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite la comparación entre dos poblaciones de ARNm y la obtención del ADNc de los genes que están sobreexpresados o expresados exclusivamente en la población ensayada comparada con la población control. De esta manera se han conseguido identificar genes de *T. hamatum* involucrados en el micoparasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* (Carpenter y col., 2005), genes de *T. reesei* que responden a determinadas condiciones de estrés (Arvas y col., 2006) o genes que ven modificada su expresión en los disruptantes del gen *Tac1*, que codifica una adenilato ciclasa implicada en el crecimiento, germinación, micoparasitismo y metabolismo secundario de *T. virens*, respecto a la cepa silvestre (Mukherjee y col., 2007).

RaSH es un método que permite identificar genes que presentan una expresión diferencial de una manera más rápida y económica que el método de sustracción basada en PCR. En este caso, se utilizan ADNc de doble cadena que se digieren enzimáticamente en pequeños fragmentos, se ligan a adaptadores y se amplifican por PCR, poniéndose en contacto posteriormente los fragmentos de PCR procedentes de la población ensayada con los de la población control. Este método se ha utilizado para identificar genes de *T. reesei* inducidos de manera temprana por celulosa (Schmoll y col., 2004), o genes de *T. harzianum* implicados en la interacción con *R. solani* y que

pueden ser buenos marcadores para la selección de cepas de biocontrol de *T. harzianum* mejoradas (Scherm y col., 2009).

3.2.4. ARRAYS

3.2.4.1. MACROARRAYS

Los *macroarrays* se construyen empleando una membrana de nylon como soporte sobre la que se depositan sondas específicas de mayor longitud que las empleadas en el caso de los *microarrays*. Presentan la ventaja de que su procesamiento es muy sencillo y el equipamiento para la adquisición de datos está disponible en la mayoría de los centros de investigación.

Esta técnica se ha utilizado para estudiar la expresión génica de cuatro especies de *Trichoderma* durante su interacción con plántulas de cacao, y ha permitido identificar y clonar promotores de *Trichoderma* que responden a estímulos medioambientales en esta interacción (Bailey y col., 2006).

La respuesta temprana de *T. harzianum* al estrés hiperosmótico se estudió empleando *macroarrays* que contenían productos de PCR procedentes de 2.496 ESTs de este hongo obtenidas en el proyecto *TrichoEST* (Delgado-Jarana y col., 2006). Los mismos *macroarrays* se usaron para analizar el perfil transcripcional de *T. harzianum* durante su interacción con raíces de plantas de tomate, observándose un aumento en la expresión de genes relacionados con procesos redox, metabolismo lipídico, detoxificación, y transporte de aminoácidos o azúcares (Chacón y col., 2007).

3.2.4.2. MICROARRAYS

Los *microarrays* representan una herramienta útil a la hora de estudiar, de manera simultánea, la expresión de miles de genes. El acceso a colecciones de datos de perfiles de expresión de mutantes, tejidos o tratamientos, ofrece una herramienta para la identificación de la función de los genes (Rensik y Buell, 2005). Existen diferentes tipos de *microarrays* dependiendo del material de partida con el que se trabaje, proteínas, tejidos (TMA), ADN (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) o ARN (*microarrays* de expresión).

La tecnología de los *microarrays* está basada en la síntesis o fijación de sondas específicas, *probes*, que representan los genes, proteínas o metabolitos, sobre un sustrato sólido, normalmente un cristal, que permita la hibridación con la molécula diana, *target*, cuyo marcaje dependerá del tipo de *microarray* (Rensink y Buell, 2005). Existen dos tipos de *microarrays* de expresión: de ADNc y de oligonucleótidos (Schulze y Downward, 2001). Las ventajas que presentan los *microarrays* de oligonucleótidos

Introducción

con respecto a los de ADNc, es que tienen una fabricación rápida y más robotizada, presentan una elevada reproducibilidad y especificidad, ya que se utilizan secuencias cortas y muchas más sondas por gen. Por el contrario, requiere equipamiento más especializado, por lo que su coste es elevado, y presenta poca flexibilidad en el diseño experimental.

Los primeros *microarrays* de *Trichoderma* se diseñaron sobre *T. reesei* y se utilizaron para estudiar la asimilación aerobia y anaerobia de la glucosa (Chamberg y col., 2002), para obtener el perfil de genes implicados en la degradación de biomasa (Foreman y col., 2003), o para identificar los genes regulados por oxígeno (Bonaccorsi y col., 2006) en este hongo.

Microarrays de *T. atroviride* han servido para identificar los genes que responden de una manera temprana a la luz, evidenciando la importancia del complejo formado por las proteínas BLR-1 y BLR-2 en la fotoconidiación (Rosales-Saavedra y col., 2006).

Samolski y col. (2009) diseñaron un *microarray* de oligonucleótidos de alta densidad (HDO), que permitió analizar las modificaciones en el perfil de expresión génica de *T. harzianum* cuando se cultivaba el hongo en medio mínimo, o en presencia de tomate, quitina o glucosa.

Recientemente, se han comparado los perfiles transcripcionales de *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei* en su interacción con *R. solani*, utilizando un *microarray* que contenía oligonucleótidos de estas tres especies (Atanasova y col., 2013).

3.3. PROTEÓMICA

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y de su función. La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas, permitiendo una visión global de los procesos que ocurren dentro de la célula, incluyendo variaciones en los niveles de expresión, modificaciones postraduccionales, interacciones entre las proteínas o su localización (Rey y col., 2004).

De esta manera se han identificado en *T. atroviride* proteínas implicadas en el metabolismo energético, transporte y tolerancia a estrés en presencia de pesticidas (Tang y col., 2010), o factores de transcripción implicados en la fotoconidiación, como es el caso de BLR-1 y BLR-2 (Sánchez-Arreguin y col., 2012).

Estudios a nivel proteómico de *Trichoderma* en interacción con patógenos han permitido identificar en *T. harzianum* una aspartil proteasa que está relacionada con el micoparasitismo y que se induce en presencia de paredes celulares de *B. cinerea*, *R. solani* y *Phytium ultimum* (Suárez y col., 2005), y varias enzimas con capacidad para degradar la pared celular de *B. cinerea* (Yang y col., 2009) o *R. solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium* spp. (Monteiro y col., 2010), como es el caso de algunas glucanasas, quitinasas, y proteasas, entre otras.

Por otro lado, también se han llevado a cabo trabajos de proteómica relacionados con la interacción *Trichoderma*-planta y *Trichoderma*-patógeno-planta. Gracias a un estudio de dos componentes, *T. asperellum*-pepino, se han podido identificar en el hongo varias enzimas degradadoras de la pared celular de la planta, como celulasas y hemicelulasas, y una enzima, la eswollenina, implicada en la colonización de raíz (Brotman y col., 2008).

Un estudio de tres componentes se ha utilizado para analizar el proteoma de *T. atroviride* en su interacción con plantas de judía y/o los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *R. solani*, observándose los mayores cambios en el perfil proteico en la interacción *Trichoderma*-judía-*R. solani* (Marra y col., 2006). Por otro lado, Morán-Diez y col. (2009) identificaron en *T. harzianum* la endopoligalacturonasa ThPG1, ya referida, mediante el análisis del proteoma del hongo en su interacción con plantas de tomate y los patógenos *B. cinerea*, *R. solani* y *P. ultimum*.

Los estudios de este tipo realizados en *Trichoderma* en interacción con patógenos y plantas han proporcionado muchos datos que han ayudado a entender mejor cómo se relaciona el agente de biocontrol con los restantes componentes del sistema, y cómo es capaz de protegerse de los compuestos tóxicos que liberan (Woo y col., 2006). Una revisión más amplia de los trabajos realizados mediante proteómica en *Trichoderma*, solo o en interacción con patógenos y/o plantas, se recoge en Hermosa y col. (2010).

3.4. METABOLÓMICA

La metabolómica es el estudio e identificación de todos los metabolitos de bajo peso molecular presentes en un organismo, tejido o grupo celular en un momento de desarrollo o condición ambiental determinado. Como en la transcriptómica y la proteómica, la metabolómica analiza un sistema dinámico, que cambia con el tiempo y aparece como una nueva herramienta funcional de la genómica que contribuye a nuestra comprensión de las complejas interacciones moleculares en los sistemas vivos.

Introducción

El número y la variedad de compuestos encontrados en el metaboloma de diferentes especies y cepas de *Trichoderma* es asombrosamente grande e incluye enzimas líticas, intermediarios metabólicos, hormonas y cientos de metabolitos secundarios con una importante función biológica. Los metabolitos secundarios son compuestos naturales con diferente composición química que no están directamente involucrados en el metabolismo primario pero que resultan indispensables en procesos como la competición, antibiosis, simbiosis, transporte de metales, diferenciación celular, etc. (Demain y Fang, 2000).

Se han realizado estudios para comprobar la función de varios de estos metabolitos secundarios de *Trichoderma* en interacción con plantas, y algunos de ellos se han relacionado con la regulación del crecimiento de éstas, así como con la activación de las defensas en las mismas (Viterbo y col., 2007; Vinale y col., 2008a, 2008b; Velázquez-Robledo y col., 2011).

Stoppacher y col. (2008) llevaron a cabo una caracterización completa del "peptaiboma", conjunto de metabolitos secundarios de tipo peptaibol, de *T. atroviride* por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas e identificaron 20 trichorzianinas y 15 nuevos compuestos denominados trichoatrokontinas.

Daejung y col. (2011) publicaron un trabajo sobre quimiotaxonomía de *Trichoderma* basado en el estudio del perfil metabolómico de diferentes especies y cepas de este hongo, y encontraron algunas diferencias respecto a las clasificaciones taxonómicas realizadas por comparación de secuencias de la región ITS.

Recientemente Malmierca y col. (2014b) han identificado por primera vez en *Trichoderma* metabolitos poliquétidos del tipo aspinolida, que intervienen en la capacidad de biocontrol y en la inducción de defensas de plantas de tomate frente a *B. cinerea*.

4. AMIDASAS

Las amidasas o amidohidrolasas son enzimas ubicuas que forman parte de la superfamilia de las nitrilasas (Pace y Brenner, 2001). La función biológica de estas enzimas es variable, estando involucradas fundamentalmente en la reducción de compuestos de nitrógeno y la producción de amonio (Chebrou y col., 1996). A nivel industrial, se emplean en combinación con nitrilo hidratasas para la producción comercial de ácidos orgánicos (ácido acrílico, ácido *p*-aminobenzoico, ácido pirazinoico, ácido nicotínico, etc.) a través de biotransformación de nitrilos (Banerjee y col., 2002). También se utilizan como catalizadores en el tratamiento de aguas

residuales (Madhavan y col., 2005; Sharma y col., 2009), y su actividad aciltransferasa se aprovecha principalmente para la síntesis de ácidos hidroxámicos activos útiles en la industria farmacéutica (Fournand y col., 1998). Por otro lado, también se ha demostrado que las amidasas pueden participar en la biosíntesis de IAA (Pollmann y col., 2003, 2006; Spaepen y col., 2007), o en la hidrólisis de pesticidas (Kay-Shoemake y col., 2000).

Las amidasas existen en organismos procariotas y eucariotas: bacterias, arqueas, hongos, cromistas, animales y plantas (Fournand y Arnaud, 2001). Estas enzimas se clasifican por su secuencia proteica en dos grandes grupos: alifáticas y aromáticas (Sharma y col., 2009). Mientras que la clasificación basada en su actividad catalítica tiene en cuenta el perfil de especificidad de sustratos, dando lugar a seis grupos principales.

Las amidasas alifáticas se dividen fundamentalmente en dos grupos: el primer grupo lo forman amidasas que hidrolizan pequeñas cadenas de amidas (acetamida, acrilamida y propionamida) y el segundo grupo hidrolizan cadenas medias de amidas como son las arilamidias, α -aminoamidias y α -hidroxiamidias. Todas estas amidas tienen actividad aciltransferasa que lleva a la formación de sus respectivos ácidos carboxílicos, hidrazidas o ácidos hidroxámicos (las sales de estos ácidos, los hidroximatos, son factores de crecimiento esenciales o vitaminas para algunos microorganismos). Como resultado de estas reacciones también se produce amonio, importante en el uso eficiente del nitrógeno (*Nitrogen Use Efficiency*, NUE) por parte de las plantas como se verá más adelante.

Aspergillus nidulans ha sido el hongo más estudiado, con varias amidasas en su genoma (Hynes y Pateman, 1970, Hynes y Davis, 2004): una formamidasa que utiliza como sustratos formamida y glicinamida; una acetamidasa capaz de hidrolizar amidas alifáticas de uno a seis átomos de carbono; y otras amidasas con actividad frente a amidas alifáticas (butiramida, valeramida, hexanamida) y con arilamidias (benzamida, fenilacetamida). La expresión de los genes que codifican estas amidasas ha sido extensamente estudiada (Hynes y Davis, 2004). El gen *amdS* que codifica la acetamidasa anteriormente mencionada ha sido usado como marcador de selección de transformantes en *Trichoderma* (Penttilä y col., 1987; Gruber y col., 2012).

5. LA IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO EN LAS PLANTAS

Cuantitativamente, el nitrógeno es el nutriente más importante para una planta y un factor limitante para su crecimiento y desarrollo (Kraiser y col., 2011). El nitrógeno es tomado del suelo y utilizado con distintos fines metabólicos, incluyendo la

Introducción

producción de ácidos nucleicos, proteínas y cofactores, así como moléculas señalizadoras y de almacenamiento de carbono y nitrógeno (C/N). La mayoría del nitrógeno añadido al suelo se pierde en el ambiente, ya que sólo un 30-50% es aprovechado por las plantas, pues el resto se pierde por escorrentía superficial, lavado de nitratos, volatilización de amonio o competición microbiana en el suelo (Garnett y col., 2009). El fuerte incremento de los costes de fertilización nitrogenada ha creado la necesidad de cultivos NUE o, lo que es lo mismo, cultivos capaces de captar, utilizar y distribuir de forma eficiente el nitrógeno que tienen disponible. Es éste un tema de vital importancia a nivel mundial y la investigación y tecnología NUE ha suscitado lo que los expertos llaman la "segunda revolución verde", con incrementos de productividad por métodos compatibles con prácticas de agricultura sostenible (Zeigler y Mohanty, 2010).

La posibilidad de que las plantas cultivadas puedan captar de forma efectiva el nitrógeno que necesitan con, o posiblemente sin, la ayuda de bacterias simbióticas, es una opción muy atractiva, considerando la situación actual de los fertilizantes nitrogenados (Kraiser y col., 2011). Algunos hongos beneficiosos, como *Trichoderma* spp. o basidiomicetos del Orden Sebaciales como *Piriformospora indica*, establecen interacciones mutualistas con las raíces facilitando la captación de nutrientes minerales, incluyendo un NUE (Weiß y col., 2011). Como consecuencia, las plantas tratadas con estos hongos pueden ser más grandes y más sanas, y ofrecer mayores rendimientos que las no tratadas. Se sabe que *Trichoderma* reprograma la expresión génica de las plantas y, como resultado, éstas aumentan su resistencia a patógenos y toleran mejor distintos estreses abióticos, favoreciendo la relación simbiótica entre ambos organismos (Shoresh y col., 2010). Aunque se ha producido un progreso significativo en el entendimiento de cómo *Trichoderma* estimula las defensas de las plantas (Hermosa y col., 2013), los mecanismos por los que se producen cambios fisiológicos que conducen a una mejora del NUE permanecen inexplorados.

OBJETIVOS

Muchas especies del género *Trichoderma* son conocidas por su capacidad como agentes de control biológico y su poder biofertilizante. Durante muchos años, se han estudiado los distintos mecanismos de *Trichoderma* como agente de biocontrol de enfermedades de plantas producidas por otros hongos, nematodos, bacterias y virus. Recientemente se está prestando mayor atención a las respuestas beneficiosas que *Trichoderma* ejerce sobre las plantas, bien estimulando el crecimiento, activando las defensas, y/o aumentando la capacidad de solubilizar nutrientes y de optimizar el uso eficiente de fertilizantes nitrogenados (NUE). Gracias al vertiginoso desarrollo de las “ómicas” (genómica, transcriptómica y proteómica) se están empezando a comprender mejor algunos de los mecanismos moleculares de la interacción a tres bandas entre *Trichoderma*, patógenos y plantas en sistemas de tres componentes.

Con el fin de identificar los genes responsables de algunos de los efectos beneficiosos que ejercen ciertas cepas de *Trichoderma* sobre las plantas, en esta Tesis Doctoral, se han diseñado *microarrays* HDO de *Trichoderma*, que se han usado para comparar las respuestas transcripcionales de cepas de distintas especies de *Trichoderma* en estadios tempranos de su interacción con plantas de tomate.

Por otro lado, con el fin de evaluar la contribución que ejerce una actividad amidasa al NUE de la rizosfera de las plantas, se expresó el gen de la acetamidasa *amdS* de *A. nidulans* en la cepa *T. harzianum* T34 y se analizaron los cambios transcriptómicos que tienen lugar en la planta en su interacción con cepas transformantes *amdS* de *Trichoderma*.

A continuación se detallan los objetivos particulares de esta Tesis Doctoral:

1. Evaluación del poder fertilizante de diferentes cepas de *Trichoderma* (representantes de la diversidad genética existente en este género) en plantas de tomate.
2. Estudio comparativo de la expresión génica de diferentes cepas de *Trichoderma* en interacción con plantas de tomate mediante el uso de *microarrays* HDO de *Trichoderma*.
3. Estudio del efecto que provoca la expresión heteróloga del gen *amdS*, que codifica una acetamidasa de *A. nidulans*, en el genoma de *T. harzianum* T34 y su implicación en la biofertilización y/o el crecimiento de las plantas.
4. Análisis del transcriptoma de plantas de tomate en su interacción con *T. harzianum* T34 y con los transformantes que expresan el gen *amdS* de *A. nidulans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ORGANISMOS UTILIZADOS

1.1. PROCARIOTAS

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 α (Hanahan, 1983) en los experimentos de transformación por choque térmico debido a la alta eficacia que puede conseguirse con ella (hasta 5×10^8 transformantes por cada μg de ADN). Entre sus características destaca la de poseer una deleción en el gen Z del operón *lac* lo que permite seleccionar por color las células transformadas que contengan plásmidos que complementen dicha deleción.

1.2. EUCARIOTAS

1.2.1. CEPAS FUNGICAS DEL GÉNERO *Trichoderma*

Las cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo.

Referencia	Especie	Cepa	Fuente	Origen geográfico
T6	<i>T. parareesei</i>	IMI 113135	Aire	Reino Unido
T7	<i>T. hamatum</i>	IMI 224801	Pienso para el ganado	India
T11	<i>T. atroviride</i>	IMI 352941	Suelo	Francia
T25	<i>T. asperellum</i>	IMI 296237	Suelo	Colombia
T34	<i>T. harzianum</i>	CECT 2413	Suelo	EE.UU.
T39	<i>T. harzianum</i>	IMI 298372	Suelo	Reino Unido
T50	<i>T. viride</i>	NBT 50	Aceite industrial	República checa
T52	<i>T. longibrachiatum</i>	NBT 52	Planta tratamiento de agua	Eslovaquia
T53	<i>T. asperellum</i>	IMI 20268	Suelo	España
T59	<i>T. virens</i>	NBT 59	Suelo de tabaco con quitosano	España
T87	<i>T. virens</i>	TAMU 29-8	C. Kenerley	EE.UU.

IMI, *International Mycological Institute*, CABI Bioscience, Egham, Reino Unido.

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

NBT, NewBiotechnic S.A., Sevilla, España.

1.2.2. MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS

En estos ensayos se utilizaron las cepas de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* CECT 2866, *R. solani* CECT 2815 y *B. cinerea* 98 (aislado de planta de fresa en nuestro laboratorio), y la cepa del oomiceto, también fitopatógeno, *P. ultimum* 8 (aislada en el Departamento de Arboricultura e Patología Vegetale de la Universidad Federico II de Nápoles).

1.2.3. TOMATE

En los ensayos de interacción *Trichoderma*-tomate se utilizaron semillas de *Solanum lycopersicum* var. Marmande tipo RAF (Batlle S.A., Molins de Rei, Barcelona).

2. VECTORES PLASMÍDICOS

- **pGEM-T® Easy** (Promega) (3.015 pb). Plásmido que procede del vector pGEM-5Zf(+). Como características más destacadas presenta:

- Un origen de replicación monocatenaria del fago f1.
- Una timina terminal en ambos extremos 3'.
- Un gen de resistencia a ampicilina, sirviendo la supervivencia en presencia de dicho antibiótico como método de detección de las bacterias que han integrado este plásmido.
- Un fragmento del gen *lacZ* (subunidad α) capaz de complementar la mutación existente en algunas cepas de *E. coli* en el gen de la β -galactosidasa (como el caso de la cepa DH5 α empleada en este trabajo), dando un color azul a las colonias crecidas en presencia de IPTG (fuerte inductor del gen *lacZ*) y X-Gal (sustrato que provoca la coloración azul al ser degradado por la β -galactosidasa). La presencia de un inserto de ADN en el fragmento del gen *lacZ* del plásmido evita la coloración azul de las colonias al no existir α -complementación.

Se utilizó principalmente para la clonación de productos de PCR obtenidos con polimerasas que añaden un nucleótido adenina en el extremo 3' (como es el caso de la *Taq*).

- **pLMG** (Montero-Barrientos, sin publicar) (4.584 pb). Plásmido derivado del vector pLMRS3 (Mach y col., 1994), que dispone de un sitio de clonación múltiple (*XbaI-Sall-NsiI*) entre el promotor del gen *gpdA* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) de *A. nidulans* y el terminador de la transcripción del gen *tcbh2* (celobiohidrolasa 2) de *T. reesei*. Se utilizó para la transformación de protoplastos de *T. harzianum*.

Vectores derivados

- **pGEM-T Easy::*amdS*** (4.915pb). Plásmido derivado del vector pGEM-T Easy en el que se clonó el gen *amdS* (1.900pb) de *A. nidulans*. Este gen se obtuvo mediante amplificación por PCR, empleando como molde ADN genómico y los oligonucleótidos *amdS*-NT y *amdS*-CT.

- **pLMG::*amdS*** (6.484pb). Plásmido derivado del vector pLMG en el que se subclonó el gen *amdS* de *A. nidulans*. Se utilizó para llevar a cabo la expresión de este gen en *T. harzianum*. El proceso de construcción del plásmido se describe en el apartado 2 de los Resultados del Capítulo 3 (Figura 16).

3. MEDIOS DE CULTIVO

Salvo que expresamente se indique otro método, los medios se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1 atm durante 20 minutos.

3.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

- **Medio Luria-Bertani (LB)** (Miller, 1972). Se empleó como medio general para el crecimiento de *E. coli*.

Composición:

NaCl	10 g
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g

H₂O destilada c.s.p. 1 L

Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH

Para medio sólido se añadieron 15 g de agar por litro.

El medio se suplementó con ampicilina (100 µg/mL) para la selección de bacterias portadoras de plásmidos con resistencia al antibiótico. Para bacterias portadoras de plásmidos con selección de color (β-galactosidasa), el medio se suplementó con IPTG (25 µM) y X-Gal (50 µg/mL).

- **Medio YT 2x** (Sambrook y Russel, 2001). Medio rico empleado para el crecimiento rápido de *E. coli*.

Composición:

Bactotripton	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g

H₂O destilada c.s.p. 1 L

Se ajustó el pH a 7,0

3.2. MEDIOS DE CULTIVOS PARA HONGOS Y PLANTAS

- **CM**. Empleado como medio líquido de crecimiento de *Trichoderma* para la posterior preparación de protoplastos.

Composición:

Extracto de malta	5 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	5 g

H₂O destilada c.s.p. 1 L

Materiales y Métodos

- **Patata dextrosa agar (PDA, Potato Dextrose Agar)**. Se empleó como medio sólido general para el crecimiento de *Trichoderma* y los microorganismos fitopatógenos. Este medio se adquirió a Sigma, que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 39 g en 1 L de agua destilada. El medio se suplementó con acetamida 10 mM, acrilamida 10 mM, formamida 10 mM o urea 10 mM para la caracterización fenotípica de los transformantes de *T. harzianum* que expresan el gen *amdS* de *A. nidulans*.

- **Caldo de patata dextrosa (PDB, Potato Dextrose Broth)**. Se empleó como medio líquido general para el crecimiento de hongos. Este medio fue adquirido a Sigma que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 24 g en 1 L de agua destilada. El medio se suplementó con acetamida 10 mM, acrilamida 10 mM, formamida 10 mM o urea 10 mM para la caracterización fenotípica de los transformantes de *T. harzianum* que expresan el gen *amdS* de *A. nidulans*, así como para la medida de amonio liberado al medio de cultivo.

- **PPG**. Se empleó como medio sólido general para el crecimiento de *Trichoderma*.

Composición:

Glucosa	20 g
Puré de patatas	20 g
Agar	20 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1 L

- **Medio Murashige y Skoog (MS)** (Murashige y Skoog, 1962). Medio hidropónico utilizado en los experimentos de interacción *Trichoderma*-tomate.

Composición:

Medio MS básico	4,9 g
Sacarosa	10 g

H₂O destilada c.s.p. 1L

Se ajustó el pH a 5,7 con KOH

Para medio sólido se añadieron 8 g de agar por litro.

El medio MS básico fue adquirido a Duchefa y lleva como componentes: microelementos, macroelementos y vitaminas.

- **Medio Mínimo (MM) de crecimiento de *Trichoderma*** (Penttilä y col., 1987). Se utilizó como medio líquido para posteriores estudios de expresión. Los medios MSS, MSS-top y MST se prepararon a partir del medio anterior con modificaciones, y se emplearon como medios sólidos de selección en las transformaciones de *Trichoderma*. La composición de todos estos medios se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo para *Trichoderma*.

	MM	MST	MSS	MSS-top
KH₂PO₄ (g/L)	15,0	15,0	15,0	15,0
Fuente de carbono: Glucosa (g/L)	20,0 ^a	20,0	20,0	20,0
Metales traza (ml/L)^b	1,0	1,0	1,0	1,0
Tritón X-100 (ml/L)		1,0		
Sorbitol (g/L)			182,2	182,2
Ajustar pH con KOH 1M	5,5	5,5	5,5	5,5
Agar (g/L)		15,0	15,0	30,0
H₂O destilada c.s.p. 1 L				
Autoclavar				
Enfriar hasta 50°C				
MgSO₄ 1 M(ml/L)	2,4	2,4	2,4	2,4
CaCl₂ 1 M (esterilizado por filtración) (ml/L)	4,1	4,1	4,1	4,1
(NH₄)₂SO₄ 250 mg/mL (ml/L)	20,0 ^a			
Acetamida 1M (esterilizado por filtración) (ml/L)		10,0	10,0	10,0
CsCl 1M (esterilizado por filtración) (ml/L)		12,5	12,5	12,5

^aLa glucosa y el sulfato amónico del MM se sustituyeron por acetamida a una concentración final de 10 mM cuando fue requerido.

^bMetales traza: Se preparó una solución concentrada 1000x. Composición: FeSO₄·7H₂O 5 g/L, MnSO₄·H₂O 1,6 g/L, ZnSO₄·7H₂O 1,4 g/L, CoCl₂ 2 g/L.

4. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

4.1. CULTIVO

4.1.1. *Trichoderma*

4.1.1.1. RECOGIDA DE ESPORAS

Para la obtención de esporas, *Trichoderma* se cultivó en medio PPG o PDA solo, o suplementado con acetamida 10 mM, acrilamida 10 mM, formamida 10 mM o urea 10 mM, a 25-30°C durante 9 días, el tiempo suficiente para que la superficie de la placa estuviera cubierta de esporas. Éstas se recogieron añadiendo 5 mL de agua destilada estéril por placa y raspando la superficie con una espátula o una pipeta de vidrio invertida. A continuación, se filtró la suspensión de esporas a través de lana de vidrio para eliminar restos de micelio. Las esporas se almacenaron a 4°C hasta su uso.

4.1.1.2. CULTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN, LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE TRANSFORMANTES Y LA CUANTIFICACIÓN DE AMONIO

Los cultivos para la extracción de ADN se llevaron a cabo en matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio PDB, inoculados con esporas de *Trichoderma* a

una concentración final de 10^6 esporas/mL, y que se incubaron a 28°C durante 36-48 horas, en agitación (200 rpm). La biomasa obtenida se recogió mediante filtración por vacío a través de papel de filtro. El micelio se lavó con agua destilada estéril, se congeló a -80°C y se liofilizó durante unas 12 horas, conservándose a -20°C hasta su utilización.

Los cultivos para la caracterización fenotípica de los transformantes y la cuantificación de amonio se realizaron en medio PDB o PDB suplementado con acetamida 10 mM, acrilamida 10 mM, formamida 10 mM o urea 10 mM de forma idéntica a la descrita en el párrafo anterior. Una vez filtrados, se recogieron separadamente los sobrenadantes y los micelios, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -20°C hasta su uso. Los micelios se liofilizaron y se pesaron; y los sobrenadantes se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de cuantificación de amonio y medida de pH.

4.1.1.3. CULTIVOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los cultivos para la expresión génica se hicieron en dos fases. En la primera fase (preinducción o producción de biomasa) se inocularon matraces de 1 L conteniendo 300 mL de MM (Penttilä y col., 1987) con glucosa al 2% (p/v) y esporas de *Trichoderma* a una concentración final de 10^5 esporas/mL. Se incubaron a 28°C durante 36-40 horas, en agitación (200 rpm). Transcurrido este tiempo, los cultivos se filtraron en condiciones de esterilidad mediante vacío a través de papel de filtro. Los micelios se lavaron con agua destilada estéril, y se utilizaron para inocular los medios de inducción (segunda fase). Estos medios se prepararon a partir del mismo MM (Penttilä y col., 1987) pero conteniendo acetamida 10 mM en ausencia de glucosa y sulfato amónico, y se cultivaron durante 4 horas en las condiciones de temperatura y agitación descritas anteriormente.

Para llevar a cabo extracciones de ARN, para ser usado en los análisis de expresión génica, el micelio obtenido se recogió por filtración como se describe para las preinducciones en el párrafo anterior. A continuación se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizó durante unas 12 horas, conservándose a -80°C hasta su utilización.

4.1.1.4. CULTIVOS PARA LA INOCULACIÓN DE PLANTAS EN CULTIVO HIDROPÓNICO

Se utilizaron matraces de 250 mL que contenían 100 mL de MM, inoculados con esporas de *Trichoderma* a una concentración final de 10^5 esporas/mL, y se incubaron a 28°C durante 48 horas, en agitación (180 rpm). La biomasa obtenida se recogió mediante filtración por vacío en condiciones de esterilidad. El micelio se lavó con agua destilada estéril y, posteriormente, se utilizó para la inoculación de plantas de tomate en cultivo hidropónico.

4.1.2. CULTIVO DE PLANTAS DE TOMATE EN INTERACCIÓN CON *Trichoderma*

4.1.2.1. DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

La esterilización de las semillas se realizó mediante agitación suave en una solución de etanol al 70% (v/v) durante 10 minutos. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y se añadió una solución de lejía al 50% (v/v). Las semillas se agitaron de nuevo durante 10 minutos y a continuación se retiró el líquido. Posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril en campana. Finalmente, las semillas se dejaron secar y se guardaron en una placa Petri estéril a temperatura ambiente hasta su uso.

4.1.2.2. CULTIVO EN PLACA

Este ensayo se utilizó para evaluar *in vitro* el efecto de distintas cepas de *Trichoderma* en el desarrollo del tallo y de la raíz de las plantas de tomate y para recoger material vegetal que se usaría posteriormente para el análisis de expresión de genes marcadores de defensa en planta.

Semillas de tomate, previamente esterilizadas, se germinaron en placas de MS durante 3 días para, posteriormente, evaluar el efecto sobre las mismas de diferentes cepas silvestres de *Trichoderma* (capítulos 1 y 2 de esta Tesis Doctoral), o durante 5 días para evaluar el efecto de los transformantes amdS (capítulo 3 de esta Tesis Doctoral). En ambos casos se sembraron 5 semillas por placa. Las placas se incubaron a 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y una humedad del 40%. Transcurrido este tiempo, se inocularon con 1×10^6 esporas de *Trichoderma* en el extremo opuesto a las semillas, y se volvieron a incubar en las mismas condiciones de temperatura, luz y humedad. Como controles se incluyeron placas de MS conteniendo sólo semillas de tomate, sin esporas de *Trichoderma*. Los experimentos se realizaron por triplicado y 4 días después de la inoculación con *Trichoderma*, se fotografiaron las plantas o se midió la longitud del tallo de las plantas. Cuando fue necesario, se recogió la parte aérea de las plantas 6 días después de la inoculación del hongo o del agua (en el caso de los controles), se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su utilización para el análisis de expresión de genes marcadores de defensa.

4.1.2.3. CULTIVO EN MACETA

Un ensayo de cultivo en maceta se utilizó para evaluar *in vivo* el efecto de distintas cepas de *Trichoderma* en el crecimiento de plantas de tomate. Para ello, semillas de tomate, previamente esterilizadas, se recubrieron con una suspensión acuosa de esporas de *Trichoderma* a una concentración final de 2×10^7 esporas/mL (1 mL de la suspensión de esporas por cada 30 semillas), y se dejaron secar durante toda

la noche en placas de Petri abiertas en una campana de flujo laminar. Posteriormente, las semillas de tomate recubiertas se colocaron en macetas que contenían suelo arcilloso comercial, previamente autoclavado a 121°C durante 1 hora en 2 días consecutivos. Como controles se incluyeron macetas con semillas de tomate sin tratar. Todas las macetas se incubaron en un invernadero a $22 \pm 4^\circ\text{C}$ durante 3 o 4 semanas según el ensayo y se regaron cuando fue necesario. Transcurrido el tiempo, se evaluaron parámetros como la longitud del tallo y de la raíz. Para los ensayos de *microarrays* de tomate, se recogió la parte aérea de las plantas, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su uso. Para las medidas de nitrógeno y carbono en planta, se recogió la parte aérea, se secó en la estufa a 65°C durante 2 días, se pesó y se pulverizó.

Por otro lado, para el análisis de expresión de genes marcadores de defensa en planta, semillas de tomate, previamente esterilizadas, se sembraron en macetas conteniendo suelo arcilloso comercial estéril, se incubaron en un invernadero a $22 \pm 4^\circ\text{C}$ durante 4 semanas y se regaron cuando fue necesario. Transcurrido este tiempo, se inocularon con 2 mL de una suspensión de esporas de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^6 esporas/mL o con 2 mL de agua (en el caso de los controles). La parte aérea de las plantas se recogió a las 0, 8, 24, 48 y 144 horas (6 días) después de la inoculación, se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su uso.

4.1.2.4. CULTIVO HIDROPÓNICO

Este sistema se utilizó para recoger el micelio de *Trichoderma* necesario para los ensayos de *microarrays* HDO de este hongo.

Se emplearon cajas Phytatray® estériles (Sigma) conteniendo 100 mL de medio MS líquido, en las que se colocó un puente realizado con una malla de acero estéril sobre la que se situó una gasa también estéril, ambas en contacto con el medio de cultivo. Sobre la gasa humedecida de cada una de las placas se colocaron 30 semillas de tomate y se mantuvieron durante 2 semanas en una cámara de germinación en las condiciones de temperatura, luz y humedad anteriormente descritas.

Transcurrido este tiempo, las cajas se inocularon con el micelio de *Trichoderma* obtenido tal y como se describe en el apartado 4.1.1.4. Como control, se inocularon cajas Phytatray® en ausencia de plantas de tomate. Estos cultivos hidropónicos se mantuvieron a 25°C y 80 rpm durante 20 horas. Finalmente, el micelio de *Trichoderma* se recogió por filtración (el micelio pegado a las raíces de las plantas se recuperó mediante inyecciones directas de agua), se lavó dos veces con agua destilada, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizó durante unas 12 horas, conservándose a -80°C hasta su utilización.

4.2. MANTENIMIENTO

4.2.1. BACTERIAS

Las bacterias se mantuvieron durante cortos periodos de tiempo en placas Petri a 4°C selladas con Parafilm®. Para periodos más largos se prepararon suspensiones de las mismas, y se conservaron a -80°C en glicerol al 15% (v/v) o bien en DMSO al 7% (v/v).

4.2.2. HONGOS FILAMENTOSOS Y OOMICETOS

El mantenimiento de las cepas de hongos filamentosos y oomicetos en el laboratorio se llevó a cabo por resiembras periódicas en placas Petri usando PDA o PPG como medio de cultivo. Las placas se inocularon depositando en el centro cilindros de agar procedentes de cultivos anteriores o con gotas de una suspensión de esporas, y se incubaron a 25-30°C. Una vez que los cultivos habían crecido, las placas se conservaron a 4°C selladas con Parafilm durante periodos inferiores a un mes. Para preservar la viabilidad de la colección durante periodos más largos de tiempo, se recogieron las esporas como se describe en el apartado 4.1.1.1. Posteriormente, se les añadió glicerol hasta una concentración final del 20% y se conservaron a -80°C. En el caso de *R. solani* y *P. ultimum*, se recogieron discos de agar que se mantuvieron en agua estéril y a temperatura ambiente.

4.2.3. TOMATE

Las semillas de *S. lycopersicum* se mantuvieron secas, a temperatura ambiente, en placas Petri selladas con Parafilm®.

5. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

5.1. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

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

1. Se descongelan lentamente en hielo las células competentes.
2. Se incuban en hielo 90 μ L de esas células competentes con 1-10 μ L (20-200 ng aproximadamente) del plásmido individual o ligación con que se quiera transformar durante 20 minutos.
3. Se pasan las células a un baño a 42°C durante 45 segundos.
4. Se incuban de nuevo en hielo durante 2 minutos.
5. Se añade sobre las células 1 mL de medio líquido LB y se incuban a 37°C durante 1 hora.
6. Se toman alícuotas del cultivo anterior y se extienden sobre placas Petri con medio sólido LB. Este medio se suplementa con ampicilina (100 μ g/mL) si el

plásmido es resistente a dicho antibiótico. Cuando el plásmido permite selección por color el medio LB contiene también IPTG (25 μ M) y X-Gal (50 μ g/mL).

7. Se incuban las placas en una estufa a 37°C hasta la aparición de las colonias (16-20 horas).

5.2. TRANSFORMACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS

La transformación de *T. harzianum* T34 se realizó mediante protoplastos, siguiendo el método descrito por Penttilä y col. (1987) y optimizado por Cardoza y col. (2006).

5.2.1. PREPARACIÓN DE PROTOPLASTOS

1. A partir de un stock de esporas en glicerol de *T. harzianum* T34, se siembran placas de PDA y se incuban a 28°C durante 5-6 días. Pasado este tiempo, se recogen las esporas (apartado 4.1.1.1.) y se inoculan 100 mL de medio CM con aproximadamente 5×10^8 esporas totales.
2. Una vez inoculado, el matraz se incuba a 28°C y 250 rpm durante 13-14 horas. En estas condiciones se consigue que el micelio crezca de forma laxa y con poca tendencia a la formación de precipitados.
3. El micelio se filtra a través de nylon estéril de 30 μ m de diámetro de poro (nytal, Maissa) y se lava con 100 mL de NaCl al 0,9% (p/v) y con 100 mL de TLA. Una vez filtrado, se le retira el exceso de humedad pero no se seca por completo. A partir de ahora, se trabaja con 0,5 g de micelio.
4. El micelio se resuspende bien en 50 mL de TPA conteniendo ditiotreitól (DTT) 25 mM (preparado en el momento), y se mantiene a 30°C y 250 rpm durante 2 horas.
5. Después del tratamiento con DTT, los 50 mL se centrifugan a 3600 x *g* durante 10 minutos. Para eliminar los restos de DTT, se lava el precipitado con 50 mL de TPA y se centrifuga de nuevo a 3600 x *g* durante 10 minutos.
6. Se retira el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 20 mL de TPA conteniendo enzima lítica (*LysingEnzymes*, Sigma) a una concentración final de 5 mg/mL.
7. La preparación resultante se pasa a un matraz y se incuba a 30°C y 80 rpm durante aproximadamente 2-3 horas, monitorizando cada hora la formación de protoplastos al microscopio.
8. Una vez obtenidos, los protoplastos se recogen por filtración a través de nylon de 30 μ m de diámetro de poro. Los restos de micelio quedan retenidos y los protoplastos pasan a través del nylon, diluyéndose posteriormente 1:5 en solución ST.
9. Esta suspensión se centrifuga a 3000 x *g* durante 10 minutos para sedimentar los protoplastos, y a continuación se lavan una vez con solución ST. Finalmente,

se resuspenden en aproximadamente 450 μL de solución STC. Se pasan a hielo y se cuentan en una cámara Thoma al microscopio. La concentración debe estar entre 10^7 - 10^8 protoplastos/mL. Se añade a los protoplastos 1/10 del volumen de solución PTC.

TLA: Tampón fosfato sódico 10 mM; MgSO_4 0,6 M, pH 5,8. Se esteriliza en el autoclave.

TPA: Tampón fosfato sódico 10 mM; MgSO_4 0,8 M, pH 5,8. Se esteriliza en el autoclave.

Solución ST: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; sorbitol 1 M. Se esteriliza en el autoclave.

Solución STC: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; sorbitol 1 M; CaCl_2 20 mM. Se esteriliza por filtración.

Solución PTC: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; CaCl_2 20 mM; PEG 6000 al 60% (v/v). Se esteriliza por filtración.

5.2.2. TRANSFORMACIÓN

1. Se mezclan, en hielo, de 2 a 5 μg de ADN con 200 μL de la solución de protoplastos (conteniendo una concentración entre 10^7 - 10^8 protoplastos/mL). Los tubos se dejan en hielo durante 20 minutos.
2. Se añade 1 mL de solución PTC y los tubos se dejan a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. Se añaden 1,2 mL de solución STC para diluir los protoplastos. Se mezclan bien y se siembran alícuotas de 300 μL en 7 mL de agar de cobertera (MSS-top) sobre placas de medio selectivo (MSS).
4. Las placas se dejan solidificar unos 5 minutos y se incuban a 30°C hasta que aparezcan las colonias (5-7 días).

6. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1. EXTRACCIÓN DE ADN

6.1.1. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*

6.1.1.1. MINIPREPARACIONES (*Boiling minipreps*)

Se empleó como método de rutina para la obtención de ADN plasmídico de *E. coli* cuando no era necesaria una elevada calidad ni cantidad del mismo (Sambrook y Russel, 2001).

1. Se inoculan con una colonia de bacterias 3 mL de medio LB, o bien 3 mL de medio YT 2x, suplementado con 3 μL de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
2. Se incuban a 37°C y 200 rpm durante 16 horas (medio LB) u 8 horas (medio YT 2x), para permitir el crecimiento de las bacterias.
3. Se recogen las células contenidas en 700 μL del cultivo por centrifugación a 13000 x *g* durante 1 minuto. Se descarta el sobrenadante.
4. Se añaden 110 μL de tampón STET-L, y se resuspenden las células.
5. Las muestras se hierven durante 30 segundos, y posteriormente se centrifugan a 13000 x *g* durante 10 minutos.
6. Se retira el precipitado con un palillo estéril impregnado de una solución de ARNasa (ribonucleasa A, Sigma) 10 mg/mL.

Materiales y Métodos

7. El ADN plasmídico se precipita añadiendo 100 μL de isopropanol. Se mantiene a -20°C durante al menos 15 minutos.
8. Se centrifuga a 13000 x *g* durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante.
9. El precipitado se lava con etanol al 70% (centrifugando a 13000 x *g* durante 5 minutos), se deja secar, y finalmente se resuspende el ADN en 20-25 μL de agua estéril o tampón TE.

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

Tampón STET-L: Se prepara en el momento de usarlo, añadiendo 10 μL de una solución de lisozima (Sigma) 10 mg/mL por cada 1400 μL de tampón STET.

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

6.1.1.2. LISIS ALCALINA A GRAN ESCALA

Este método se utilizó cuando era necesario procesar volúmenes de cultivo de *E. coli* superiores a 50 mL, para obtener gran cantidad de una preparación de ADN plasmídico de alta calidad. Se empleó el kit comercial “Qiagen Plasmid Midi Kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método consiste en una lisis alcalina de las células, seguida de una purificación del ADN basada en la afinidad por una resina de intercambio aniónico en condiciones adecuadas de pH y concentración salina.

De esta forma se consiguió purificar el ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* de 50-100 mL con un rendimiento aproximado de 400-800 ng/ μL de ADN en un volumen final de 500 μL .

6.1.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *Trichoderma*

6.1.2.1. EXTRACCIÓN A PEQUEÑA ESCALA

La extracción de ADN genómico a pequeña escala se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Paterson y Bridge (1994), que es una modificación del método de Raeder y Broda (1985), y se empleó para la obtención de ADN adecuado para reacciones de PCR.

1. Se pulveriza el micelio liofilizado en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Se recogen aproximadamente 40 mg de micelio pulverizado en un tubo (Eppendorf), se le añaden 500 μL de tampón de lisis y se homogeniza utilizando una punta de pipeta cortada.
3. A continuación, se añaden 250 μL de fenol saturado con TE y 250 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (CIA) (24:1).
4. Se mezcla cuidadosamente y se centrifuga a 13000 x *g* y a 4°C durante 50 minutos.
5. La fase acuosa superior se transfiere a un tubo nuevo, se añaden 10 μL de una solución 10 mg/mL de ARNasa y se incuba a 37°C durante 30 minutos, con

objeto de eliminar el ARN que permanece junto con el ADN tras el paso anterior.

6. Pasado este tiempo, se añade un volumen de CIA 24:1. Se mezcla delicadamente y se centrifuga a 13000 x *g* y a 4°C durante 10 minutos.
7. De nuevo, la fase acuosa superior se transfiere a otro tubo para proceder a la precipitación del ADN. Se le añade 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, y se mantiene a -20°C durante al menos 2 horas.
8. La muestra se centrifuga a 13000 x *g* y a 4°C durante 10 minutos, después se retira el sobrenadante.
9. El precipitado se lava con etanol al 70% con objeto de eliminar las sales, y se centrifuga a temperatura ambiente, retirando de nuevo el sobrenadante.
10. Después, se deja secar el precipitado y se resuspende en 100 µL de tampón TE.

Tampón de lisis: Tris-HCl 200 mM, pH 8,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS al 0,5% (p/v).

6.1.2.2. EXTRACCIÓN RÁPIDA

En algunas ocasiones es necesario extraer ADN genómico de muchos cultivos simultáneamente para, por ejemplo, realizar experimentos de PCR. Para evitar el complicado proceso que se describe en el apartado 6.1.2.1., se puede llevar a cabo el siguiente protocolo, tomado de van Zeijl y col. (1998):

1. Con un palillo estéril se inoculan esporas en tubos (Eppendorf) con 200 µL de PDB.
2. Se incuban a 30°C durante 48 horas.
3. El micelio obtenido se transfiere a nuevos tubos conteniendo 50 µL de tampón KC + Novozym234 (Sigma) (2,5 mg/mL), y se incuban a 37°C durante 60 minutos.
4. Se añaden 150 µL de tampón de dilución, y posteriormente se incuban a 95°C durante 3 minutos.
5. Finalmente los tubos se ponen en hielo durante, al menos, 5 minutos para permitir que los restos de micelio decanten.
6. Para las reacciones de PCR se emplea como molde 1 µL de estos sobrenadantes.

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

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

6.1.2.3. EXTRACCIÓN A MAYOR ESCALA

Este protocolo se empleó para obtención de ADN que posteriormente se usó en hibridaciones tipo *Southern blot*:

1. La extracción a mayor escala se realiza en tubos de 10 mL. En primer lugar, se llenan con unos 120 mg de micelio, liofilizado y pulverizado previamente.

Materiales y Métodos

Después, se añaden 4 mL de tampón de lisis, 2 mL de fenol y 2 mL de CIA en este orden; y se mezclan por inversión cuidadosamente.

2. Se centrifugan a 7000 x *g* a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio y se añaden 30 µL de ARNasa (10 mg/mL).
4. Las muestras se incuban a 37°C durante 15 minutos.
5. Se añade un volumen equivalente al obtenido en el paso 3 de fenol-CIA (1/2 volumen de cada uno).
6. Se centrifugan a 4000 x *g* y a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio y se añade un volumen equivalente de CIA.
8. Se centrifuga de nuevo a 4000 x *g* a temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y el ADN se precipita adicionando 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,4 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Las muestras se dejan a -20°C durante al menos 2 horas.
10. Posteriormente se centrifugan a 9000 x *g* a 4°C durante 20 minutos, y se retira el sobrenadante.
11. El precipitado se lava con 1 mL de etanol al 70%, se centrifuga a temperatura ambiente, y se retira de nuevo el sobrenadante.
12. Finalmente se deja secar el precipitado y se resuspende en 200 µL de tampón TE.

6.2. EXTRACCIÓN DE ARN

Con el fin de reducir el riesgo de degradación de ácidos ribonucleicos por la actuación de ARNasas, todas las soluciones se prepararon en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma) al 0,1% (v/v), durante 12 horas, y posteriormente autoclavada. Además se empleó material de vidrio esterilizado por calor seco, lotes nuevos de puntas y tubos de plástico estériles.

6.2.1. MÉTODO DEL TRIZOL

Para llevar a cabo la extracción de ARN total se utilizó el método del TRIZOL® (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se parte de 6-35 mg de micelio de *Trichoderma* o de 100 mg de tejido vegetal fresco, pulverizado en mortero en presencia de nitrógeno líquido. El material se transfiere a tubos (Eppendorf) a los que se añade 1 mL del reactivo TRIZOL®.
2. Las muestras se homogeneizan con ayuda de una micropipeta y por agitación en vórtex. Posteriormente, se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos.

3. A cada tubo se le añaden 0,2 mL de cloroformo, agitando después en vórtex durante 15 segundos, e incubando a temperatura ambiente durante 2-3 minutos.
4. Seguidamente, los tubos se centrifugan a 12000 x *g* y a 4°C durante 15 minutos, con el fin de eliminar los restos celulares. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo, se le añade un volumen de isopropanol, y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la precipitación del ARN.
5. A continuación se centrifuga a 12000 x *g* y a 4°C durante 10 minutos. El precipitado se lava con 1 mL de etanol-DEPC al 70% (agitando en vórtex hasta separar el precipitado del tubo), y se centrifuga de nuevo a 7500 x *g* y a 4°C durante 5 minutos.
6. El etanol se elimina por inversión y el precipitado se deja secar al aire, resuspendiéndolo después en 30-50 µL de agua destilada tratada con DEPC.
7. Finalmente, el ARN se incuba a 60°C durante 10-20 minutos para ayudar a su completa resuspensión.

6.2.2. ARN PARA MICROARRAYS

Para la obtención de ARN de *S. lycopersicum* para los ensayos de *microarrays* se utilizó el kit comercial “NucleoSpin® RNA Plant” (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

7.1. CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

La cantidad de ácidos nucleicos se determinó espectrofotométricamente en un equipo *GeneQuant™ pro RNA/DNA Calculator* (Amersham). El ADN se cuantificó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm, considerando que una unidad de densidad óptica equivalía a una concentración de ADN de 50 µg/mL. El ARN se cuantificó midiendo la densidad óptica a la misma longitud de onda, considerando que una unidad de densidad óptica correspondía a una concentración de ARN de 40 µg/mL.

La calidad de las preparaciones así como la bondad de las cuantificaciones realizadas, se comprobaron siempre mediante electroforesis en geles de agarosa usando marcadores de concentración conocida.

Para los ensayos de *microarrays* el análisis de las muestras de ARN total se llevó a cabo en un equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema está basado en una electroforesis convencional pero desarrollada sobre un *chip*. Las moléculas fluorescentes son intercaladas entre las

moléculas de ARN que migran en función de su tamaño. La señal fluorescente emitida es transformada en bandas (similares a las obtenidas en un gel de agarosa) y picos (electroferograma). En el electroferograma se determina el área obtenida para los picos que se corresponden con el ARN 18S y 28S. Con ayuda de un marcador, con una relación concentración/área conocida, se extrapolan los resultados de área obtenidos para las muestras.

7.2. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

7.2.1. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ADN

7.2.1.1. DIGESTIÓN

Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las recomendaciones del proveedor (Roche). Cada una de ellas tiene unas condiciones óptimas de digestión en cuanto a concentración de sales, temperatura y tiempo de incubación. Como norma general, el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de digestión debido a la alta concentración en glicerol de las soluciones de almacenamiento, condiciones que incluso podrían inhibir su propia actividad. Asimismo, es conveniente que el ADN esté lo suficientemente diluido y limpio con el fin de no alterar las condiciones de reacción.

1. Se mezclan en un tubo: 1/10 del volumen total de digestión de tampón de digestión (10x), la cantidad adecuada de ADN disuelto en agua o en tampón TE, las unidades que se consideren necesarias de enzima y agua destilada estéril hasta completar el volumen de digestión.
2. La mezcla se incuba a la temperatura adecuada (normalmente 37°C) durante 3-7 horas.

7.2.1.2. GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS

El rellenado de extremos 5' prominentes originados por cortes con enzimas de restricción se realizó usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa (Fermentas).

1. Se resuspende el ADN en 13 μ L de agua y se añaden 2 μ L de tampón Klenow 10x.
2. Se añade 1 μ L de dNTPs 10 mM y 1 unidad del fragmento Klenow.
3. La mezcla se incuba a 37°C durante 10 minutos y, posteriormente, la reacción se para calentando a 70°C durante 10 minutos.

Tampón Klenow 10x: Tris-HCl 500 mM, pH 8; MgCl₂ 50 mM; DTT 10 mM.

7.2.1.3. LIGACIÓN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima ligasa del fago T4 (Roche). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10 μ L conteniendo 1 μ L de tampón de ligasa 10x, proporcionado con la enzima, 10-40 ng de ADN vector, al menos una cantidad equimolar de ADN inserto y 1 U de ligasa T4. La ligación se incubó a 16°C durante 12 horas para fragmentos con extremos romos.

Tampón de ligación Roche 10x: Tris-HCl 660 mM, pH 7,5; MgCl₂ 50 mM; DTT 50 mM; ATP 10 mM.

7.2.2. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ARN

7.2.2.1. TRATAMIENTO DE ARN CON ADNasa

Este tratamiento se realizó con el fin de eliminar restos de ADN genómico de las preparaciones de ARN total que posteriormente se utilizaron en reacciones de *Real Time* PCR. Se empleó la enzima ADNasa RQ1, libre de ARNasa (Promega).

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 100 μ L conteniendo 10 μ L de tampón de ADNasa 10x, proporcionado con la enzima, 50 μ g de ARN total y 5 U de ADNasa RQ1. Se incubó a 37°C durante 30 minutos, y a continuación el ARN se limpió por fenolización. Después, se recuperó el ARN mediante precipitación a -20°C con 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 4,5 y 2,5 volúmenes de etanol frío, y posterior centrifugación.

Tampón ADNasa RQ1 Promega 10x: Tris-HCl 400 mM, pH 8,0; MgSO₄ 100 mM; CaCl₂ 10 mM.

7.2.2.2. SÍNTESIS DE ADNc

7.2.2.2.1. PARA HIBRIDACIÓN DE MICROARRAYS

Para la síntesis del ADNc utilizado en los ensayos con *microarrays*, se empleó el kit comercial “Transplex® Whole Transcriptome Amplification” (Sigma), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

7.2.2.2.2. PARA *Real Time* PCR

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit comercial “PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)” (Takara), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. En un tubo de microcentrífuga se mezclan, en el siguiente orden: 2 μ L de tampón de reacción 5x, 0,5 μ L de oligodT (50 μ M) y 2 μ L de enzima.
2. Se añaden 0,5 μ g de ARN y agua destilada tratada con DEPC hasta un volumen final de reacción de 10 μ L.
3. La mezcla se incuba a 37°C durante 15 minutos (síntesis del ADNc) y, posteriormente, a 85°C durante 5 segundos (inactivación de la enzima por calor).

4. El tubo de reacción se conserva a -20°C hasta su uso.

7.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

7.3.1. REACCIÓN CLÁSICA

Las reacciones de PCR convencionales se realizaron empleando *Taq* polimerasa (Biotools). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 µL conteniendo el ADN molde, 5 µL de tampón de PCR 10x, proporcionado con la enzima, 2 mM de MgCl₂, 400 µM de dNTPs, 1 µM de cada oligonucleótido y 2,5 U de polimerasa.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos que incluían: 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a la temperatura establecida empíricamente para cada par de oligonucleótidos (hibridación), y, finalmente, un tiempo aproximado de 1 minuto por cada kb a amplificar a 72°C (extensión). Tras esos 35 ciclos la amplificación se completó con una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

7.3.2. REACCIÓN CON POLIMERASAS DE ALTA FIDELIDAD

Para reacciones de amplificación que requerían una alta fidelidad se empleó *Pfu* polimerasa (Fermentas), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

7.3.3. REACCIÓN DE CADENA LARGA

Las PCRs para amplificar fragmentos largos de ADN (mayores de 2 kb) se realizaron utilizando el sistema "PCR Extender System-5 Prime" (Eppendorf), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema contiene una mezcla de ADN polimerasas termoestables con altas tasas de extensión y una máxima capacidad correctora. Además el sistema contiene dos tampones de reacción que se usaron en función del tamaño del ADN que se deseaba amplificar. La temperatura óptima de extensión, en este caso, fue de 60°C.

7.3.4. Real Time PCR

El principio de esta técnica consiste en la detección de los productos de PCR mediante la utilización de SYBR Green, colorante que emite fluorescencia al unirse a las moléculas de ADN de doble cadena durante la amplificación. Una posterior medida de la intensidad de la fluorescencia emitida nos permite determinar la cantidad de producto de PCR amplificado en una muestra.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL a la concentración final que se indica:

- 5 µL SYBR Green Master (Rox) (Roche)
- 0,2 µL oligo *forward* (concentración final de 200 nM)
- 0,2 µL oligo *reverse* (concentración final de 200 nM)
- 3,6 µL agua miliQ

- 1 μL ADNc (1,8 ng) como molde de reacción.

Las amplificaciones se realizaron, en triplicado, en un equipo ABI Prism® 7000 (Applied Biosystems) que se programó con las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 1 minuto a 60°C (anillamiento) y 1,5 minutos a 72°C (extensión). Se realizó una medida continua de la fluorescencia emitida en un rango de 60-95°C aumentando la temperatura 0,2°C por segundo. Finalmente las muestras se mantuvieron a 4°C.

Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de *Real Time* PCR fueron analizados previamente mediante una curva de disociación para determinar posibles productos inespecíficos como la formación de dímeros.

Para calcular la expresión génica relativa, se utilizó el modelo $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, que parte del supuesto de que la eficiencia con la que se amplifica el gen problema y el gen de referencia es óptima e idéntica (correspondiente al 100%) (Livak y Schmittgen, 2001).

Se validó el uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak y Schmittgen, 2001) mediante la realización de una curva de eficiencia de amplificación para cada uno de los oligonucleótidos utilizados, tal y como se muestra a continuación:

$$y = mx + b$$

$$E = 10^{[-1/m]}$$

y= variable dependiente
m= pendiente de la recta
x= variable independiente
b= corte en el eje y
E= eficiencia

Para esta ecuación, la pendiente (m) debe tener un valor aproximado entre -3,2 y -3,5 (siendo ideal un valor de -3,32), lo cual indica una eficiencia de amplificación cercana al 95- 100%. El valor de la eficiencia (E) debe ser cercano a 2, o idealmente igual a 2, indicando una eficiencia de amplificación cercana al 100% o del 100%, respectivamente.

De esta forma, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ expresa las diferencias entre los valores Ct (ciclo en el que la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido) de la muestra y del control, tal y como se muestra a continuación:

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct control}]}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta\Delta\text{Ct}]}$$

7.3.5. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por las casas comerciales Sigma o Isogen Life Science, y se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilidad
g6pd-fw	GTCAAGACTCTTGCCTATGAC	Expresión del gen <i>g6pd</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
g6pd-rev	GCTCTTGAAGTACTTGACGG	Expresión del gen <i>g6pd</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
vir1-fw	CAAACCTCCGTCTATTTACCA	Expresión del gen <i>vir1</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
vir1-rev	ACATCATTCCAAGAATCATCGG	Expresión del gen <i>vir1</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
gab-fw	CTCCCATATTGTTACTTTCTC	Expresión del gen <i>gab</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
gab-rev	AATGTATGTTCTTGTCCCT	Expresión del gen <i>gab</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
cut-fw	TATGGTGCCTCTCAAGTCTG	Expresión del gen <i>cut</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
cut-rev	AGTACCTTGGCTATAGCCAC	Expresión del gen <i>cut</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
cbhl-fw	AGGATTTACTCTCGACACCA	Expresión del gen <i>cbhl</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
cbhl-rev	ATGTTGGCGTAGTAATCATCC	Expresión del gen <i>cbhl</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
hfbII-fw	GAAGTTCTTCACCATCGCCAC	Expresión del gen <i>hfbII</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
hfbII-rev	TTGCAGTCGAGGCCAATGATGC	Expresión del gen <i>hfbII</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
tub-fw	GAATATCAACAATACCAGGATGC	Utilizado como gen endógeno <i>microarrays Trichoderma</i>
tub-rev	AGGATTGGTATTGATCATCAGCA	Utilizado como gen endógeno <i>microarrays Trichoderma</i>
ABC-fw2	CGAGACGTACCATGGCCAGAT	Expresión del gen <i>ABC</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>

ABC-rev2	CTCGTTGAGCGTTGTCGGACT	Expresión del gen <i>ABC</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
Alcohol DH-fw	GCCGAATTTCTTCTTGAACCT	Expresión del gen <i>ADH</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
Alcohol DH-rev	GAATTGTAGCCGCCTCATCC	Expresión del gen <i>ADH</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
CSRP-fw	CCCCTGACTTACCAGGAGTA	Expresión del gen <i>CSRP</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
CSRP-rev	GTAAGAGTTGCCGACAATGCC	Expresión del gen <i>CSRP</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
DH red-fw2	TTGAGAGAGTCCTGGTAGTCG	Expresión del gen <i>DH</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
DH red-rev2	AACGCTTGCTTCGACGATATCG	Expresión del gen <i>DH</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
MFS-fw	GTGTCATTCTCATGGCTGGT	Expresión del gen <i>MFS</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
MFS-rev	TGATGAATCGAGTGAAGAAGGAG	Expresión del gen <i>MFS</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
MAT-fw	CATAAACGACCCGAACCGAC	Expresión del gen <i>MAT</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
MAT-rev	TATACGACTAAGCCAATCACCT	Expresión del gen <i>MAT</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
PG mutase-fw	AGGTTACCGAGCGACCTCACG	Expresión del gen <i>PG</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
PG mutase-rev	AATGACACCGGCGAGGATCTC	Expresión del gen <i>PG</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
Monoxygenasa-fw	CACTGGAGTCATGACACAGC	Expresión del gen <i>SM</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
Monoxygenasa-rev	GTCGACAATGCCTTCTTCCA	Expresión del gen <i>SM</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
p450-fw	GGGACATTATTCGGGAGAGG	Expresión del gen <i>P450</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
p450-rev	GATGATGAAAGCCGATGACAG	Expresión del gen <i>P450</i> . Validación <i>microarrays Trichoderma</i>
ICS1-fw	GTTCTCTCCAAGAAATGTCC	Expresión del gen de defensa <i>ICS1</i>
ICS1-rev	TCCTTCAAGGTCATCAAATC	Expresión del gen de defensa <i>ICS1</i>

Materiales y Métodos

PR1-fw	CCTCAAGATTATCTTAACGCTC	Expresión del gen de defensa <i>PR1</i>
PR1-rev	TACCATTGCTTCTCATCAACC	Expresión del gen de defensa <i>PR1</i>
LOX1-fw	GCCTCTCTTCTTGATGGA	Expresión del gen de defensa <i>LOX1</i>
LOX1-rev	GTAGTGAGCCACTTCTCCAA	Expresión del gen de defensa <i>LOX1</i>
EIN2-fw	GTTGCTAAGTGATGCTGTA	Expresión del gen de defensa <i>EIN2</i>
EIN2-rev	CGCTCAAGCATGCTGGGCC	Expresión del gen de defensa <i>EIN2</i>
amdS-NT	ATGCCTCAATCCTGGGAA	Obtención del gen <i>amdS</i> de <i>A. nidulans</i> .
amdS-CT	CTATGGAGTCACCACATT	Obtención del gen <i>amdS</i> de <i>A. nidulans</i>
gpd3F	ATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATC	Comprobación de construcción pLMG:: <i>amdS</i> . Obtención de sonda para <i>Southern blot</i>
amdS-3	TTCCTCCCGGCCTTTTCTT	Comprobación de construcción pLMG:: <i>amdS</i>
Tcbh2-R	GAGCTCAACCCAAAGGAGGG	Comprobación de construcción pLMG:: <i>amdS</i>
cbh2	GTTGCTCATTGCGGTCTACC	Obtención de sonda para <i>Southern blot</i>
amdS-RT1	TCGACGGCAATGCCTTCCAC	Expresión del gen <i>amdS</i>
amdS-RT2	TCGCCGGATGCACTGATATC	Expresión del gen <i>amdS</i>
amdS-RT4	GTGGACGCCATACAAGCACGA	Comprobación de construcción pLMG:: <i>amdS</i> .
Q2413-fw	TGGCGTTGAATTGAGTTTGTGT	Utilizado como gen endógeno <i>Trichoderma</i>
Q2413-rev	CCCTCCGTATGGGTTTTAAGGT	Utilizado como gen endógeno <i>Trichoderma</i>
PCK-fw	CTCAGAGGGAATTTGAGGTTTCC	Expresión del gen <i>PEPCK</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
PCK-rev	GTGTCTCAGTACTTGTTTCAGCTG	Expresión del gen <i>PEPCK</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate

BGP-fw	GAGAGGAGATTCCGCACTCATC	Expresión del gen <i>BGP</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
BGP-rev	AGCAGCCCAACTCAACAAGGTT	Expresión del gen <i>BGP</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
NR-fw	GTACGAGCTATCGATGAGACCC	Expresión del gen <i>NR</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
NR-rev	ATTGGTTTCCAGGTTGGGTC	Expresión del gen <i>NR</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
HTTP-fw	ATGGCTCCTGCTCTTGAACAA	Expresión del gen <i>HTTP</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
HTTP-rev	ATCAGATTTTCGTAGCGAGACG	Valid Expresión del gen <i>HTTP</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
PLDB1-fw	TCCTGATATTTTGGGAATAGC	Expresión del gen <i>PLDB1</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
PLDB1-rev	CAGCACATTCTTACCACACACTA	Expresión del gen <i>PLDB1</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
Avr9N-fw	GGTGGAGATAATTTGGTGAATA	Expresión del gen <i>Avr9-N</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
Avr9N-rev	TTATGATTTGTATAGATTGAGCC	Expresión del gen <i>Avr9-N</i> . Validación <i>microarrays</i> Tomate
Actina-fw	CACCACTGCTGAACGGGAA	Utilizado como gen endógeno <i>microarrays</i> Tomate
Actina-fw	GGAGCTGCTCCTGGCAGTTT	Utilizado como gen endógeno <i>microarrays</i> Tomate

7.4. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

7.4.1. ELECTROFORESIS DE ADN

Los fragmentos de ADN se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa, a una concentración variable del 0,8-1,2% (p/v) dependiendo del tamaño del ADN que se deseaba separar.

1. Se añade la cantidad adecuada de agarosa al volumen necesario de tampón TAE 1x y se funde por ebullición en un microondas.
2. Se deja enfriar hasta unos 55-60°C. En este punto, se añade bromuro de etidio hasta una concentración final aproximada de 1 µg/mL.
3. Se vierte el gel en la bandeja de electroforesis y se deja que solidifique.
4. Se preparan las muestras añadiendo tampón de carga 6x.

Materiales y Métodos

5. Se lleva a cabo la electroforesis en tampón TAE 1x aplicando un voltaje aproximado de 5 V por cm de longitud de la cubeta, incluyendo marcadores de peso molecular comerciales.
6. Se visualizan las bandas mediante iluminación con luz ultravioleta, y se fotografía el gel si procede.

Tampón TAE 50x: Tris-acetato 2 M, pH 8,0; EDTA 50 mM. Se pesan 242 g de Tris. Se añaden 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0.

Tampón de carga 6x: Sacarosa al 40%; azul de bromofenol al 0,25% (p/v); xileno cianol FF al 0,25% (p/v).

7.4.2. ELECTROFORESIS DE ARN

Para las electroforesis de muestras de ARN los tampones se prepararon en agua tratada con DEPC. El resto del material necesario (cubetas, peines, bandejas) se mantuvo en NaOH 0,2 M durante, al menos, 30 minutos, y posteriormente se lavó con agua destilada tratada con DEPC.

Para comprobar la calidad de las extracciones de ARN, se hizo una electroforesis en un gel de agarosa (condiciones no desnaturalizantes) al 1%, tal y como se indica en el apartado anterior para las muestras de ADN. Se consideró que el ARN extraído era de calidad cuando pudieron apreciarse clara y nítidamente las bandas correspondientes a los ARNs ribosómicos 18S y 28S.

7.5. PURIFICACIÓN

7.5.1. FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN de interés se cortaron del gel de agarosa con ayuda de un bisturí y se purificaron con el kit “GeneClean® II” (Qbio Gene) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.5.2. ARN PARA MICROARRAYS

Para purificar el ARN total de *Trichoderma* o de la parte aérea de las plantas, que posteriormente se emplearía en la hibridación de *microarrays*, se utilizó el kit comercial “RNeasy MinElute Cleanup Kit” (Quiagen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

7.6. SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, utilizando 3 pmoles del oligonucleótido de interés por reacción. Se usaron 400-600 ng de ADN plasmídico (en un volumen de 5

µL de agua destilada estéril) extraído de *E. coli* tal y como se indica en el apartado 6.1.1.2. La secuenciación directa de productos de PCR se realizó a partir de 100 ng de ADN por kb de longitud del producto.

8. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN

8.1. TRANSFERENCIA DE ADN DE GELES DE AGAROSA A MEMBRANAS (*Southern blot*)

Se realizaron digestiones de aproximadamente 10 µg de ADN genómico tal y como se describe en el apartado 7.2.1.1. Los fragmentos originados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio aplicando bajo voltaje (2 V por cm de longitud de la cubeta). Una vez fotografiado, el gel fue sometido al siguiente protocolo:

1. Se trata con HCl 0,25 N durante 15 minutos en agitación moderada, con el fin de fragmentar las moléculas de ADN mayores de 10 kb. A continuación, se lava varias veces con agua destilada.
2. Se sumerge el gel en la solución de desnaturalización durante 45 minutos, también en agitación moderada. Se lava posteriormente con agua destilada.
3. Se sumerge en la solución de neutralización durante 45 minutos, también en agitación.
4. Posteriormente, el gel se equilibra en tampón SSC 10x durante 45 minutos, en agitación, mientras se prepara lo necesario para la transferencia.
5. La transferencia se lleva a cabo por capilaridad desde el gel a una membrana de nylon, cargada positivamente, Hybond™ N⁺ (Amersham). Para ello, el gel se sitúa sobre un puente de papel de filtro Whatman® 3MM que está en contacto con un tanque de tampón SSC 10x, y saturado con el mismo. Sobre el gel se colocan sucesivamente, la membrana de nylon del tamaño del gel, 2 papeles Whatman 3MM, una pila de papel absorbente y finalmente un peso aproximado de 0,5 kg. Es importante eliminar las burbujas de aire que se puedan formar al superponer las distintas capas. La transferencia por capilaridad así dispuesta se mantiene, al menos, durante 12 horas.
6. Tras la transferencia, la membrana se pasa a SSC 2x durante 2 minutos. Se deja secar al aire y se irradia con luz ultravioleta en un *Stratalinker* (Stratagene) aplicando 120 mJ durante 30 segundos para fijar los ácidos nucleicos a la misma.

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

Solución de neutralización: NaCl 3 M; Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5.

SSC 20x: NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M. Se ajusta a pH 7,0 con NaOH.

8.2. DISEÑO DE MICROARRAYS

8.2.1. MICROARRAYS DE *Trichoderma*

Los *microarrays* de *Trichoderma* utilizados en este trabajo fueron de diseño propio. En su construcción se incluyeron 12.662 secuencias únicas de *Trichoderma* (9.510 *singlets* y 3.152 *contigs*) (Samolski y col., 2009), 9.129 genes de *T. reesei* QM6a y 11.643 genes de *T. virens* T87. Las 12.662 secuencias únicas de *Trichoderma* (991 de las cuales correspondieron a *T. virens* T59) se obtuvieron a partir de 14.273 transcritos derivados de ESTs de 12 cepas de *Trichoderma*, pertenecientes a ocho especies diferentes (Vizcaíno y col., 2006b, 2007). Cada *microarray* contuvo 374.824 sondas correspondientes a 34.138 transcritos: 11 sondas para 34.026 transcritos y menos de 11 sondas para 112 transcritos que habían pasado los filtros de calidad previos.

8.2.2. MICROARRAYS DE TOMATE

Se utilizaron los *microarrays* comerciales de oligonucleótidos “GeneChip Tomato Genome Arrays” (Affymetrix). Cada *microarray* contuvo 101.794 sondas correspondientes a 9.254 transcritos (11 sondas para cada uno de los transcritos).

8.3. MARCAJE DE LAS SONDAS

8.3.1. Southern blot

Para este marcaje se utilizaron dCTPs con digoxigenina unida. Para incorporar estos dCTPs a la sonda se realizó mediante el método de oligonucleótidos al azar (*random priming*), utilizando el producto DIG-High Prime (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El producto de la reacción de marcaje fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y purificado a partir del gel, empleando el método indicado en el apartado 7.5.1.

8.3.2. MICROARRAYS

Para los *microarrays* de *Trichoderma*, el marcaje del ADNc y posterior purificación del ARNc se realizó con el kit “One-Color DNA labeling” (NimbleGen, Roche), mientras que para los *microarrays* de tomate, se empleó el kit “GeneChip IVT Labeling” (Affymetrix) siguiendo, en ambos casos, las recomendaciones de la casa comercial correspondiente.

8.4. PREHIBRIDACIÓN, HIBRIDACIÓN Y LAVADOS

8.4.1. PREHIBRIDACIÓN DE MEMBRANAS

La prehibridación tiene como finalidad, además de equilibrar la membrana con el tampón de hibridación, bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido los ácidos nucleicos transferidos y que pueden unir inespecíficamente los fragmentos de ADN usados como sonda. La prehibridación se llevó a cabo en el tampón de hibridación correspondiente durante un mínimo de 60 minutos. El volumen del tampón añadido no debe superar los 100 μL por cm^2 de membrana.

8.4.2. HIBRIDACIÓN Y LAVADOS

La especificidad de la hibridación depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura, concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de los lavados posteriores.

8.4.2.1. HIBRIDACIÓN CON SONDAS PARA *Southern blot*

Las hibridaciones con las sondas se realizaron a 65°C durante, al menos, 12 horas en tampón de hibridación, al que se le añadió la sonda desnaturalizada. La desnaturalización se realizó por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y enfriamiento en hielo durante al menos 2 minutos.

Posteriormente se retiró el tampón de hibridación con la sonda (se puede guardar a -20°C para ser reutilizado) y se procedió a hacer los lavados. La membrana se sometió a dos lavados con SSC 2x y SDS al 0,1% durante 15 minutos, el primero a temperatura ambiente y el segundo a 65°C. A continuación, se realizó un lavado más con SSC 0,2x y SDS al 0,1% a 65°C durante 15 minutos.

Tampón de hibridación: Para preparar 200 mL, se añaden en este orden 148 mL de agua, 0,4 mL de SDS al 10%, 2 mL de sarcosina al 10% (p/v) y 50 mL de SSC 20x. Se mantiene la mezcla a 65°C durante 5-10 minutos y se añaden después 2 g de *Blocking Reagent* (Roche). Se calienta y agita la mezcla a 65°C durante 30-45 minutos y posteriormente se deja enfriar.

8.4.2.2. HIBRIDACIÓN CON SONDAS PARA *MICROARRAYS*

Los *chips* utilizados en este trabajo se hibridaron con 15 μg de ARNc fragmentado para las distintas muestras. Para llevar a cabo estas hibridaciones, se utilizó un sistema compuesto por un horno de hibridación (permite realizar la hibridación de un gran número de *chips* de manera simultánea), una unidad de procesamiento (realiza el proceso de lavado de los *chips*), y un láser.

8.5. DETECCIÓN

8.5.1. *Southern blot*

La detección se realizó con anticuerpos frente a digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. El revelado de la actividad fosfatasa se llevó a cabo mediante una reacción quimioluminiscente empleando el reactivo *CDP-Star* (Roche). Para ello se siguió, con ligeras modificaciones, el siguiente protocolo que proporciona la casa comercial:

1. Tras llevar a cabo los lavados, se trata la membrana con tampón de lavado (*washing buffer*) a temperatura ambiente durante 5 minutos.
2. Se añade sobre la membrana solución de bloqueo y se incuba en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. Se añade sobre la solución anterior el anticuerpo *AntiDIG-AP Fab fragments* (Roche) a una dilución 1:20000 y se incuba en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. Se hacen dos lavados de 15 minutos con tampón de lavado.
5. Se añade tampón de detección durante 3-5 minutos para equilibrar la membrana.
6. Se retira el tampón y se añade el reactivo *CDP-Star* (Roche), diluido 1:100 en tampón de detección, sobre la membrana y se cubre la misma con un papel de plástico transparente para facilitar la distribución del reactivo por toda la superficie de la membrana. Se incuba 5 minutos en oscuridad.
7. Finalmente se expone a una película radiográfica (Fujifilm) en un *cassette* EC-DW (Fujifilm) durante 1-15 minutos y se revela.

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

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

Solución de bloqueo: *Blocking Reagent* al 1% (p/v) en tampón maleico.

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

8.5.2. *MICROARRAYS*

En el caso de los *microarrays* de *Trichoderma*, la digitalización de las señales de fluorescencia emitidas después de la hibridación se realizó con el escáner *AxonGenePix 4000B*, utilizando el programa *NimbleScan 2.3*. Los datos obtenidos, correspondientes a la inducción o represión de genes en las distintas condiciones ensayadas, se depositaron en la base de datos GEO con el número de acceso GSE29171.

En el caso de los *microarrays* de tomate, la detección de la fluorescencia emitida por el *chip* se realizó con el sistema *Gene Array Reader* (Affymetrix). Los resultados fueron analizados con un paquete informático compuesto por el programa GCOS, que permite digitalizar los datos de fluorescencia generados por el láser, y el programa *Desktop Mining Solution* (Micro DB 3.0, Data MiningTool 3.0), que permite la identificación, en un rango de significación, de los genes inducidos y/o reprimidos en

cada experimento, mediante el uso de las bases de datos generales junto con la base de datos de Affymetrix.

8.6. REUTILIZACIÓN DE MEMBRANAS (*Southern blot*)

Las membranas se sometieron al siguiente tratamiento para su reutilización:

1. Inicialmente se sumergen en agua destilada estéril y, a continuación, se realizan dos lavados de 15 minutos con una solución de NaOH 0,2 N y SDS al 0,1%.
2. Por último, se mantienen durante, al menos, 10 minutos en SSC 2x.

9. ENSAYOS DE CRECIMIENTO, PIGMENTACIÓN Y ESPORULACIÓN DE *Trichoderma*. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS TRANSFORMANTES

Para realizar un estudio fenotípico de los transformantes de *Trichoderma* que expresan el gen *amdS* de *A. nidulans*, 1×10^6 esporas de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas se depositaron, en un volumen final de 15 μ L, en el centro de placas de PDA y PDA suplementadas con acetamida 10 mM, acrilamida 10 mM, formamida 10 mM o urea 10 mM. Las placas se incubaron a 28°C. A las 72 horas de incubación se midió el área de crecimiento y se analizó la pigmentación. Y tras 9 días de incubación se midió la esporulación, para ello las esporas de cada placa se recogieron tal y como se describe en el apartado 4.1.1.1. El número de esporas en suspensión se determinó usando una cámara Thoma.

Para completar el estudio fenotípico de los transformantes, se midió el pH de los sobrenadantes y se pesaron los micelios, previamente liofilizados durante unas 12 horas, obtenidos de los cultivos en PDB o PDB suplementado con 10 mM de acetamida, acrilamida, formamida o urea, tal y como se describe en el apartado 4.1.1.2.

10. CUANTIFICACIÓN DE AMONIO

Para determinar la cantidad de amonio liberado al medio de cultivo por *Trichoderma* se utilizó el kit comercial "Spectroquant® Ammonium Test" (Merck), siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Se emplearon 5 mL de los sobrenadantes de *Trichoderma* obtenidos tal y como se describe en el apartado 4.1.1.2 y se añadieron 600 μ L del reactivo NH₄-1 y una cucharada del reactivo NH₄-2 (100 mg aproximadamente). Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 4 gotas del reactivo NH₄-3 y

se dejaron reposar las muestras a temperatura ambiente durante 40 minutos. Posteriormente, se midió la densidad óptica a 690 nm. Como control se utilizaron 5 mL de medio de cultivo sin inocular con *Trichoderma*. La cantidad de amonio liberado se determinó por extrapolación sobre una recta patrón realizada simultáneamente con diluciones de NH_4Cl de concentración conocida en el rango de 0-250 μM .

11. ENSAYOS ANTIFÚNGICOS *in vitro* EN CULTIVOS DUALES

La cepa silvestre y las cepas mutantes de *T. harzianum* se enfrentaron a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *R. solani*, *P. ultimum* y *B. cinerea*, en placas de PDA. Cilindros de agar de 5 mm procedentes de colonias en crecimiento activo de *T. harzianum* y el patógeno se colocaron en las placas con 5,5 cm de separación y se incubaron a 28°C. El comportamiento de cada una de las cepas de *Trichoderma* frente a los patógenos se observó hasta que dichas cepas rodearon por completo o sobrecrecieron la colonia del patógeno. Cada uno de los enfrentamientos se llevó a cabo por triplicado.

12. MEDIDA DE NITRÓGENO Y CARBONO EN PLANTAS DE TOMATE

Para evaluar el efecto de los transformantes de *Trichoderma* que expresan el gen *amdS* de *A. nidulans* en el estatus nutricional de plantas de tomate, se determinó la cantidad de nitrógeno y carbono presentes en la parte aérea de las mismas. La concentración de carbono total y nitrógeno se realizó mediante un analizador elemental. Estos análisis fueron llevados a cabo por el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC (Murcia).

Semillas de tomate, previamente esterilizadas, se recubrieron con una suspensión acuosa de esporas de *Trichoderma* y se colocaron en macetas que contenían suelo arcilloso comercial (apartado 4.1.2.3.). Después de 3 semanas, se recogió la parte aérea de la planta tomando aleatoriamente 5 grupos de 5 plantas por condición. Cada grupo se consideró como una muestra aleatoria. El tejido vegetal se secó a 65°C durante 2 días, se pasó y se pulverizó con ayuda de un molinillo y se envió a analizar su contenido en nitrógeno y carbono (0,5 g por muestra).

13. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICA Y SOFTWARES UTILIZADOS

13.1. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS SIMILARES EN BASES DE DATOS

La búsqueda de homología de secuencias de interés con otras depositadas en bases de datos se realizó utilizando el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*). Este algoritmo constituye una colección de diferentes programas que permiten

distintas combinaciones entre ácidos nucleicos y proteínas, sean estos las secuencias problema o las bases de datos de secuencias. Lleva a cabo alineamientos de tipo local entre una secuencia desconocida y una base de datos. Las mayores ventajas de BLAST son su gran velocidad y la evaluación estadística que realiza de los resultados. El parámetro estadístico correspondiente al valor E se calcula en función de que un alineamiento ocurra por azar. Por ejemplo, si tenemos un valor E igual a 0, significa que la probabilidad de que ese alineamiento haya ocurrido por azar es 0.

Las comparaciones de secuencias usando las diferentes variantes del algoritmo BLAST (BLASTN, BLASTX, BLASTP) se llevaron a cabo en la página web del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

La búsqueda de homología de las secuencias de las sondas expresadas diferencialmente en los *microarrays* de tomate se realizó a través de la base de datos "Tomato Functional Genomics" en la página web http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/TFGD/array/probe_annotation.cgi.

13.2. VISUALIZACIÓN DE CROMATOGRAMAS

El programa *Chromas* (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>) permitió el manejo de cromatogramas y la exportación de secuencias génicas a distintos formatos.

13.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

13.3.1. DATOS OBTENIDOS EN MICROARRAYS

En los experimentos de *microarrays* se utilizó un juego de sondas para medir los niveles de expresión de un único gen. Para el cálculo de la señal de expresión por juego de sonda en cada uno de los *microarrays* se utilizó el algoritmo RMA (*Robust Microarray Analysis*) (Irizarry y col., 2003) que incluye tres pasos: corrección del *background* (ruido de fondo), normalización por cuantiles y cálculo sumariado de la señal por juego de sonda.

Para identificar los juegos de sondas que mostraron diferencias significativas en el nivel de expresión entre los distintos *microarrays* se utilizó el algoritmo SAM (Tusher y col., 2001), utilizando un umbral FDR (*False Discovery Rate*) (Benjamini y Hochberg, 1995) de 0,25 o 0,10 en el caso de los *microarrays* de *Trichodema* y de 0,10 en el caso de los de tomate. El análisis se realizó utilizando el software R del programa Gene Spring GX. Los transcritos que mostraron una expresión diferencial significativa entre los distintos *microarrays* se anotaron en términos GO (*Gene Ontology*) (Ashburner y col., 2000).

13.3.2. DATOS OBTENIDOS EN OTROS ENSAYOS

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos se sometieron a un análisis de varianza para comprobar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas. Para ello se aplicó el test de Fisher o el test de Duncan del programa IBM SPSS Statistics versión 19.0 para Windows (SPSS).

13.4. HERRAMIENTAS DE EDICIÓN

En esta memoria se usaron los siguientes programas de edición específicos de biología molecular o manejo de bibliografía:

- *EditSeq*, que forma parte del paquete informático Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, EE.UU.).

- Para el estudio teórico previo de oligonucleótidos y reacciones de PCR se utilizó la aplicación *Primer Select* (Lasergene, DNASTAR Inc.).

- *pDRAW* (www.acaclone.com). Se utilizó para dibujar y editar plásmidos a partir de su secuencia.

- *Endnote* (Thompson ISI Research Soft, www.endnote.com). Se utilizó para la gestión y edición de la bibliografía.

14. CASAS COMERCIALES

- **Affymetrix:** Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU. (www.affymetrix.com).
- **Agilent Technologies:** Santa Clara, California, EE.UU. (www.agilent.com).
- **Amersham:** Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia (www.amershambiosciences.com).
- **Applied Biosystems:** Foster City, California, EE.UU. (www.appliedbiosystems.com).
- **Biotoools:** Biotoools B y M Labs, Madrid, España (www.biotoools.net).
- **Duchefa:** Duchefa Biochemie BV, Haarlem, Holanda (www.duchefa.com).
- **Eppendorf:** Eppendorf, Hamburgo, Alemania (www.eppendorf.com).
- **Fermentas:** Fermentas Life Science, Burlington, Ontario, Canadá (www.fermentas.com).
- **Fujifilm:** Fuji Photo Film Europa, Düsseldorf, Alemania (www.fujifilm.es).
- **Invitrogen:** Invitrogen, Groningen, Holanda (www.invitrogen.com).
- **Isogen:** Isogen Life Science, Maarssen, Holanda (www.isogen-lifescience.com).
- **Macherey-Nagel:** Macherey-Nagel GmbH & CokG, Düren, Alemania (www.mn-net.com).
- **Maissa:** Sefar Maissa, SAU, Barcelona, España (www.sefar.com).

- **Merck:** Merck KGaA, Darmstadt, Alemania (www.merck.com).
- **Promega:** Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU. (www.promega.com).
- **QBio Gene:** QBio Gene, Montreal, Quebec, Canadá (www.qbiogene.com).
- **Qiagen:** Qiagen GmbH, Hilden, Alemania (www.qiagen.com).
- **Roche:** Roche Applied Science, Basilea, Suiza (www.roche.com).
- **Sigma:** Sigma-Aldrich Co., San Luis, Missouri, EE.UU. (www.sigma-aldrich.com).
- **Stratagene:** Stratagene, La Jolla, California, EE.UU. (www.stratagene.com).
- **Takara:** TakaraBio Inc., Otsu, Shiga, Japón (www.takara-bio.com).
- **Whatman:** Whatman Laboratory Products Inc. Clifton, New Jersey, EE.UU. (www.whatman.com).

CAPÍTULO 1

RESULTADOS

1. EFECTO DE DIFERENTES CEPAS DE *Trichoderma* EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE PLANTAS DE TOMATE

Para evaluar el efecto de 10 cepas diferentes de *Trichoderma* (todas las cepas recogidas en la Tabla 1 de Materiales y Métodos, a excepción de *T. parareesei* T6) sobre el desarrollo de plantas de tomate, se realizó un ensayo de interacción *in vitro*, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.2 de Materiales y Métodos.

Este ensayo *in vitro* mostró que la inoculación de las distintas cepas de *Trichoderma* afectaba a la arquitectura del sistema radical de las plántulas de tomate, observándose tanto efectos positivos como negativos, dependiendo de la cepa inoculada. Los efectos más evidentes se observaron en el caso de las cepas *T. hamatum* T7 (T7), *T. harzianum* T34 (T34) y *T. virens* T87 (T87), que se seleccionaron para estudios posteriores. Las cepas T7 y T34 mostraron los mayores efectos beneficiosos en cuanto a elongación radical y desarrollo de raíces secundarias, mientras que T87 mostró efectos perjudiciales para las raíces y, además, las plantas presentaron una menor área foliar y un menor número de hojas verdaderas que las plantas control en tres experimentos independientes (Figura 6).

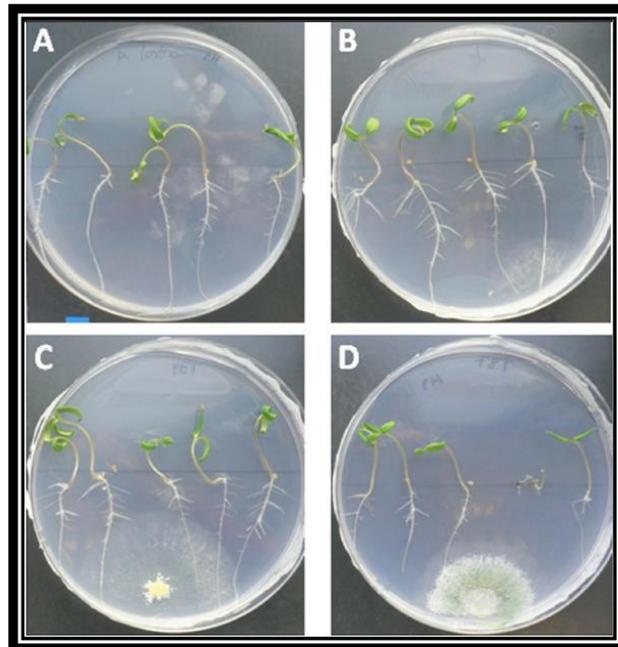


Figura 6. Efecto de las tres cepas de *Trichoderma* seleccionadas en plántulas de tomate. Plántulas de tomate germinadas y crecidas durante 3 días en medio MS, suplementado con sacarosa al 1%, agar al 0,8%, pH 5,7, se inocularon con: (A) agua, (B) *T. hamatum* T7, (C) *T. harzianum* T34 o (D) *T. virens* T87. Las fotografías se tomaron 4 días después de la inoculación con 1×10^6 esporas de *Trichoderma* o con agua en el caso de las placas control.

Posteriormente, se realizó un ensayo de interacción *in vivo* sembrando semillas de tomate recubiertas con esporas de las cepas T7, T34 y T87 en macetas conteniendo suelo comercial, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.3 de Materiales y Métodos.

Al cabo de 4 semanas se evaluó el efecto de estas tres cepas de *Trichoderma* en el crecimiento de las plantas de tomate, y se pudo observar una reducción significativa de la longitud del tallo y de la raíz de las plantas en su interacción con T87, mientras que el crecimiento se vio prácticamente inafectado por las cepas T7 y T34 (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de las cepas T7, T34 y T87 de *Trichoderma* en el crecimiento de plantas de tomate. Las longitudes de raíces y tallos corresponden a plantas de 4 semanas sin tratar (control), o tratadas con las cepas T7, T34 o T87. Cada valor es la media de 24 medidas \pm su desviación estándar. Los valores con las mismas letras dentro de una misma columna no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Fisher.

Cepa	Longitud de raíz (cm)	Longitud del tallo (cm)
Control	10,19 \pm 2,72 ^a	8,73 \pm 2,05 ^a
T7	9,70 \pm 2,15 ^{a,b}	9,79 \pm 1,93 ^a
T34	11,43 \pm 1,48 ^a	9,07 \pm 1,08 ^a
T87	8,06 \pm 2,11 ^b	6,99 \pm 1,84 ^b

2. GENES DE *Trichoderma* EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A PLANTAS DE TOMATE

Con objeto de estudiar el efecto de la presencia de plantas de tomate en la expresión génica global de las tres cepas de *Trichoderma*, seleccionadas en base al ensayo *in vitro* descrito en el apartado 1, se hibridaron *microarrays* HDO de *Trichoderma* de diseño propio. En dicho diseño se incluyeron 12.662 secuencias únicas de *Trichoderma*, obtenidas a partir de transcritos derivados de ESTs, 9.129 genes de *T. reesei* QM6a y 11.643 genes de *T. virens* T87, tal y como se describe en el apartado 8.2.1 de Materiales y Métodos, y NimbleGen (Roche) fue la casa comercial encargada de la construcción de los mismos. Estos *microarrays* se hibridaron con ADNc de T7, T34 y T87 obtenidos de cultivos de cada una de estas cepas en presencia y ausencia de plantas de tomate (seis condiciones diferentes).

Para obtener las muestras de ADNc de *Trichoderma*, se recogió el micelio de cada una de las cepas tras 20 horas de interacción con plantas de tomate de 2 semanas en cultivo hidropónico, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.4 de Materiales y Métodos. En la Figura 7 se muestra el diseño experimental utilizado para la obtención de dichos micelios en interacción con la planta. Como controles se utilizaron micelios de las cepas de *Trichoderma* obtenidos de forma similar pero en ausencia de plantas de tomate. Se utilizaron tres réplicas biológicas por cada condición. Los micelios obtenidos para cada réplica y condición se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, se

liofilizaron y se usaron para realizar la extracción de ARN total siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos.



Figura 7. Caja Phytatray® en la que se llevó a cabo la interacción *Trichoderma*-tomate, para un análisis posterior de expresión génica mediante *microarrays*.

Una vez obtenido el ARN total de cada una de las réplicas para cada condición, éste se purificó y se envió a la casa comercial NimbleGen (Roche) donde se realizó el análisis del ARN, la obtención del ADNc, el marcaje de las sondas y su posterior hibridación con los *microarrays* de *Trichoderma*, como se describe en los apartados 7.5.2, 7.1, 7.2.2.2.1, 8.3.2 y 8.4.2.2 de Materiales y Métodos, respectivamente. El tratamiento estadístico de los datos se realizó de la forma descrita en el apartado 13.3.1 de Materiales y Métodos.

2.1. ANÁLISIS GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los perfiles de expresión, obtenidos tras el análisis de los *microarrays*, de las tres cepas de *Trichoderma* en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo en comparación con el medio basal sin planta, fueron similares para las tres réplicas biológicas realizadas, tal y como se puede observar en el mapa caliente representado en la Figura 8.

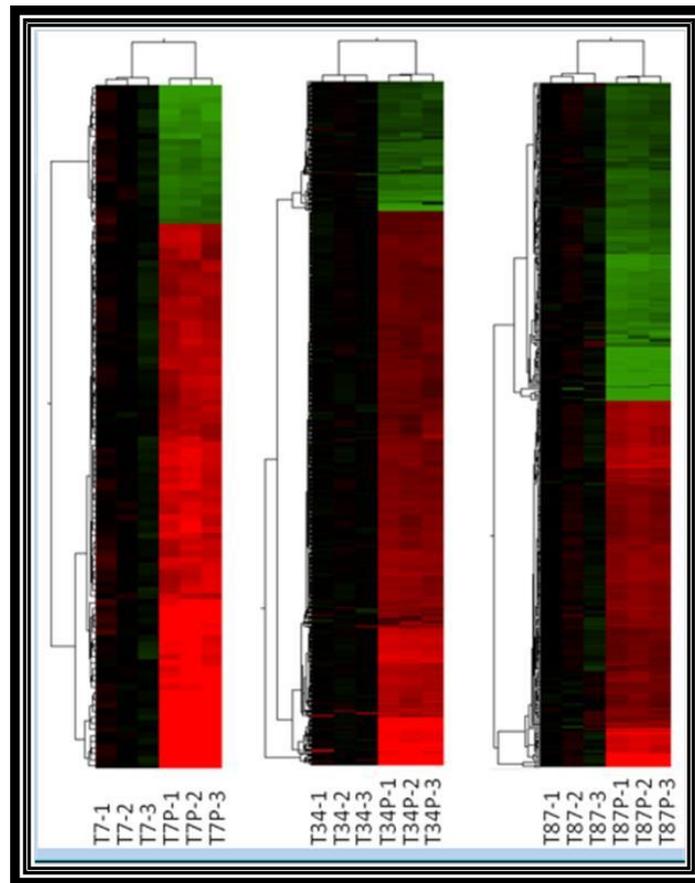


Figura 8. Mapa caliente que representa los perfiles de expresión de *Trichoderma* spp. obtenidos mediante análisis de *microarrays*. Los juegos de sondas que mostraron cambios significativos de expresión (valor $P \leq 0,05$) de al menos dos veces ($FC \geq 2$) en *T. hamatum* T7, *T. harzianum* T34 y *T. virens* T87 en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo (T7-P, T34-P y T87-P) en comparación con el medio basal solo (T7, T34 y T87) se seleccionaron para establecer un agrupamiento jerárquico. Se utilizaron tres réplicas biológicas (1, 2 y 3) procedentes de tres cultivos diferentes para cada condición experimental. Los juegos de sondas infrarregulados aparecen marcados en verde y los sobrerregulados en rojo.

De un total de 34.138 juegos de sondas depositados en los *microarrays* de *Trichoderma*, 1.077 (3,15%) presentaron cambios significativos, de al menos dos veces su expresión (*Fold Change*: $FC \geq 2$ y *FDR*: 0,25) en T7, T34 y/o T87 en respuesta a la presencia de plantas de tomate con respecto a los controles sin planta.

En la Figura 9 se muestra la distribución de esos 1.077 juegos de sondas expresados diferencialmente mediante un diagrama de Venn. La mayoría (1023) presentaron cambios de expresión en una sola cepa en interacción con la planta, correspondiendo 593, 336 y 94 juegos de sondas a las cepas T34, T87 y T7, respectivamente.

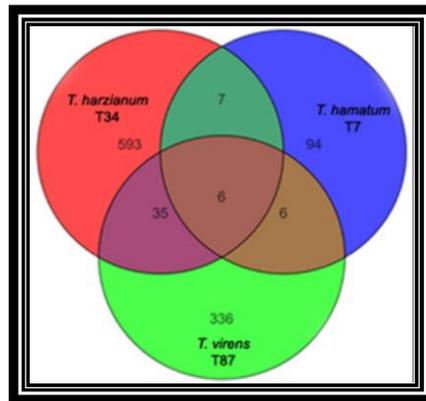


Figura 9. Diagrama de Venn que muestra el número de juegos de sondas de los *microarrays* de *Trichoderma* que presentaron cambios significativos de expresión en T7, T34 y/o T87 en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo en comparación con el medio basal sin planta.

Los 54 juegos de sondas que mostraron diferencias significativas de expresión en, al menos, dos de las cepas de *Trichoderma* en su interacción con plantas de tomate, aparecen recogidas en la Tabla 5, pudiéndose observar que el metabolismo de los carbohidratos y el transporte fueron los procesos biológicos comúnmente más sobrerrepresentados.

Únicamente seis juegos de sondas se expresaron diferencialmente en las tres cepas (Tabla 5). Se pudo observar un aumento en la expresión de genes que codifican las proteínas N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlnNAc-6P) deacetilasa y glucosamina-6-fosfato (Gln-6P) desaminasa, relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la biosíntesis de pared celular. También se observó un aumento de expresión de un gen que codifica una coenzima A-transferasa, proteína relacionada con el metabolismo lipídico, en la interacción de T34 y T87 con la planta, mientras que dicha expresión disminuyó en la cepa T7.

A pesar de los efectos beneficiosos similares que ejercieron T7 y T34 en las plántulas de tomate en los ensayos *in vitro* descritos en el apartado 1, solamente siete juegos de sondas se expresaron diferencialmente en ambas cepas en interacción con la planta (Tabla 5). La mayor parte de ellos correspondieron a genes que codifican proteínas hipotéticas o genes que no presentan homología con las secuencias depositadas en las bases de datos. Los otros juegos de sondas correspondieron a genes que codifican una proteína ribosómica 40S, relacionada con la traducción, y una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), también llamada fortalina o P23, que es una proteína con actividad chaperona relacionada con la proliferación mitótica durante los estadios tempranos de la diferenciación celular (Felts y Toft, 2003).

El mayor número de juegos de sondas comúnmente alterados entre parejas de cepas se observó entre T34 y T87, en las que el metabolismo redox y el transporte

fueron los procesos mejor representados (Tabla 5). Sin embargo, únicamente 6 juegos de sondas se expresaron diferencialmente en común en las cepas T7 y T87 en su interacción con la planta, correspondiendo en su mayoría a genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos.

Tabla 5. Resumen de los 54 juegos de sondas que mostraron diferencias significativas ($FC \geq 2$ y $FDR: 0,25$) de expresión en, al menos, dos de las condiciones de cultivo consideradas: T7, T34 y T87 en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo en comparación con el medio basal sin planta. La descripción de estos juegos de sondas se basó en su homología con secuencias presentes en la base de datos UNIPROT empleando el algoritmo BLAST, considerando un valor $E < 10^{-5}$.

Descripción juegos de sondas	Triplete T7-T34- T87	Pareja T7-T34	Pareja T7-T87	Pareja T34- T87
Coenzima A-transferasa	1			
Lactosa permeasa				2
Glucosamina-6-fosfato (Gln-6P) desaminasa (<i>g6pd</i>)	3			
N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlnNAc-6P) deacetilasa	1		1	1
Sin homología	1	2		2
Proteínas hipotéticas de función desconocida		3	2	8
TCTP*		1		
Proteína ribosómica		1		
Glucosaminidasa			1	
Quitinasa			1	
Glutamina sintetasa			1	
Regulador transcripcional				2
Transportador multidrogas				1
Precursor de endo- α -1,4- poligalactosaminidasa				1
Oxidoreductasa				9
4-aminobutirato permeasa				4
Transportador ABC				1
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa				2
Isocitrato liasa				1
4-aminobutirato transaminasa				1

*TCTP, Proteína tumoral controlada traduccionalmente.

2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE *T. hamatum* T7 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE

Un total de 113 juegos de sondas mostraron cambios estadísticamente significativos ($FC \geq 2$ y $FDR: 0,25$) en su expresión en la interacción de *T. hamatum* T7 con plantas de tomate (Figura 9): 90 de ellos (79,6%) aumentaron su expresión (sobrerregulados) y 23 (20,4%) la disminuyeron (infrarregulados) (Tabla 6). El 68% de los juegos de sondas sobrerregulados y el 74% de los infrarregulados se debieron a la hibridación con secuencias únicas derivadas de ESTs de 12 cepas de *Trichoderma* depositadas en los *microarrays* (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen del número y porcentaje de juegos de sondas en los *microarrays* HDO de *Trichoderma* que mostraron cambios significativos en el nivel de expresión en *T. hamatum* T7 en respuesta a la presencia de plantas de tomate.

Juegos de sondas con expresión aumentada (sobrerregulados)		Juegos de sondas con expresión reducida (infrarregulados)	
90 (79,6%)	61 (67,8%) spp.	23 (20,04%)	17 (74,0 %) spp.
	7 (7,8%) <i>T. reesei</i>		3 (13,0%) <i>T. reesei</i>
	22 (24,4 %) <i>T. virens</i>		3 (13,0%) <i>T. virens</i>

Se asignaron categorías GO a 59 de esos 113 juegos de sondas, y estos 59 se agruparon en seis grandes categorías GO significativamente sobrerrepresentadas en T7 en presencia de plantas de tomate. Ya que varios términos GO se solapan, finalmente se identificaron 14 juegos de sondas diferentes sobrerrepresentados que se agruparon en dos procesos fisiológicos: metabolismo de carbohidratos y transporte (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de los procesos fisiológicos significativamente sobrerrepresentados en *T. hamatum* T7 en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo en comparación con el medio basal sin planta. Estos procesos fisiológicos agruparon los 14 juegos de sondas identificados dentro de 6 categorías GO significativamente sobrerrepresentadas (valor P corregido < 0,05) en T7 en presencia de plantas de tomate, tras un análisis usando el programa Gene Spring GX.

Proceso fisiológico	Descripción juegos de sondas	Juegos de sondas sobrerregulados	Juegos de sondas infrarregulados
Metabolismo de carbohidratos	GlnNAc-6P deacetilasa	2	
	Quitinasa	4	1
	Gln-6P desaminasa	4	
	Hexoquinasa	1	
Transporte	Transportadores MFS		2

Respecto al metabolismo de carbohidratos, genes que codifican las proteínas GlnNAc-6P deacetilasa y Gln-6P desaminasa aumentaron su expresión en la interacción de T7 con la planta. También se observó un aumento en la expresión de un gen que codifica una proteína con actividad hexoquinasa. Además, T7 fue la cepa que presentó un gran número de juegos de sondas expresados diferencialmente relacionados con quitinasas en interacción con la planta, viéndose aumentada la expresión de genes homólogos a las quitinasas G1, 18-13 y 18-17 (pertenecientes a la clase III de la familia 18 de las glicosil hidrolasas), y reducida la expresión del gen que codifica la quitinasa VIR1 (perteneciente a la clase V de la misma familia).

Respecto al transporte, se apreció una disminución de la expresión de genes transportadores de sustratos generales (transportadores MFS, *Major Facilitator Superfamily*).

2.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE *T. harzianum* T34 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE

Un total de 641 juegos de sondas mostraron cambios estadísticamente significativos ($FC \geq 2$ y $FDR: 0,25$) en su expresión en la interacción de *T. harzianum* T34 con plantas de tomate (Figura 9): 519 de ellos (81,0%) aumentaron su expresión (sobreexpresados) y 122 (19,0%) la disminuyeron (infraregularizados) (Tabla 8). El 65% de los juegos de sondas sobreexpresados y el 50% de los infraregularizados se debieron a la hibridación con secuencias únicas derivadas de ESTs de 12 cepas de *Trichoderma* depositadas en los *microarrays* (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen del número y porcentaje de juegos de sondas en los *microarrays* HDO de *Trichoderma* que mostraron cambios significativos en el nivel de expresión en *T. harzianum* T34 en respuesta a la presencia de plantas de tomate.

Juegos de sondas con expresión aumentada (sobreexpresados)		Juegos de sondas con expresión reducida (infraregularizados)	
519 (81,0%)	336 (64,7%) spp.	122 (19,0%)	61 (50,0%) spp.
	19 (3,7%) <i>T. reesei</i>		29 (23,8%) <i>T. reesei</i>
	164 (31,6%) <i>T. virens</i>		32 (26,2%) <i>T. virens</i>

Se asignaron categorías GO a 325 de esos 641 juegos de sondas. Un análisis posterior reveló que 235 categorías GO estaban significativamente sobrerepresentadas en T34 en presencia de plantas de tomate respecto a la cepa sin planta. Finalmente se identificaron 186 juegos diferentes de sondas sobrerepresentados que se agruparon en varios procesos fisiológicos, siendo el transporte y el metabolismo de carbohidratos los procesos más afectados (Tabla 9).

Tabla 9. Procesos fisiológicos significativamente sobrerepresentados en *T. harzianum* T34 en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo en comparación con el medio basal sin planta. Estos procesos fisiológicos agruparon los 186 juegos de sondas identificados dentro de 235 categorías GO significativamente sobrerepresentadas (valor P corregido $< 0,05$) en T34 en presencia de plantas de tomate, tras un análisis usando el programa Gene Spring GX.

Proceso fisiológico	Descripción juegos de sondas	Juegos de sondas sobreexpresados	Juegos de sondas infraregularizados
Metabolismo de carbohidratos	GlnNAc-6P deacetilasa	2	
	Celobiohidrolasa	2	

	Quitinasa	1	
	Cutinasa	2	
	Precursor de endoquitinasas de clase V		1
	β -Galactosidasa	1	
	β -Glucanasa	1	
	Gln-6P desaminasa	3	
	β -Glucosidasa	2	
	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	4	
	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	3	
	Glicerol quinasa	1	
	Hexoquinasa	1	
	Isocitrato deshidrogenasa	5	
	Oxidorreductasa	1	
	Fosfoenolpiruvato sintetasa	3	
	Fosfoglucomutasa		3
	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta y alcohol deshidrogenasa	11	1
	Transaldolasa	1	
	Xilanasa	3	
	Xilosidasa		1
Metabolismo de lípidos y ácidos grasos	Acetil-CoA acetiltransferasa	2	
	β -cetoacil sintetasa		3
	3-cetoacil-ACP (proteína transportadora de acilos) reductasa	2	
	Lacasa		2
	Ácido lipoico sintetasa	1	
Metabolismo de aminoácidos	Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada	3	
	Glucosa-metanol-colina oxidorreductasa	5	
	Glutamina sintetasa	1	
	Glicina deshidrogenasa	1	
	Transcetolasa	2	
Metabolismo de ácidos carboxílicos	4-aminobutirato transaminasa/succinato-semialdehído deshidrogenasa	9	
	Isocitrato liasa	1	
	Enzima málica dependiente de NADP	1	
Metabolismo energético	ATPasas	4	
Metabolismo de ácidos nucleicos y nucleótidos	Alantoinasa	1	
	Helicasa de ARN dependiente de ATP	1	
Metabolismo de vitaminas	3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferasa	1	
Transporte	Aminoácidos	18	
	Cationes		1
	Factor de elongación 3	1	
	Exostosina-2	1	

Resultados Capítulo 1

	Flavoproteína	1	
	Transportadores MFS	24	3
	Transportador ABC de maltosa	1	
	iones metálicos	5	
	Proteínas transportadoras mitocondriales	7	
	Canal iónico mecanosensible	1	
	Proteína de exportación nuclear Noc3	1	
	Transporte nuclear (proteína de unión a GTP nucleolar)	1	
	Ácidos nucleicos y nucleótidos	1	
	Oligopéptidos	2	
	Sulfito reductasa	1	
	Familia de intercambiadores sodio/hidrógeno	1	
	Proteína tipo tiorredoxina	1	
Comunicación celular	Hidrofobina	1	3
Detoxificación	5-aminolevulinato sintetasa	1	
	Citocromo P450 monooxigenasa	1	
Modificación Postraduccional	Proteinasa aspártica	1	
	Proteína de biosíntesis de diftamida	1	
	Nitrilasa/cianida hidratasa	2	
	Serín-proteasa tipo subtilisina	1	
	Tiorredoxina I	1	
Regulación	Activador transcripcional PIR121	3	
	Regulador de la ruta de señalización de proteínas G	1	
Transcripción y traducción	Aspartil-ARNt sintetasa	1	
	Proteína de choque térmico de 70 KDa/Factor de intercambio de nucleótidos	2	
	Proteína de unión a poliadenilato	1	
	ARNr 2'-O-metiltransferasa fibrilarina	1	
	Ubiquitina	1	

La relevancia de los procesos de transporte en la interacción de T34 con plantas de tomate quedó de manifiesto con la sobrerregulación de 67 juegos de sondas, dentro de los que se incluyeron 24 relacionados con proteínas transportadoras MFS, 18 con transportadores de aminoácidos, siete con proteínas transportadoras mitocondriales y uno con un transportador ABC de maltosa.

Esta cepa en interacción con plantas de tomate también mostró un aumento de expresión de un gran número de genes que codifican enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos e implicadas en el apoyo nutricional del hongo (β -galactosidasa, celobiohidrolasa, endo-1,4- β -glucanasa, xilanasa, etc.) y en funciones celulares básicas (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato sintetasa, etc.). También se pudo observar un aumento de expresión

de juegos de sondas relacionados con cutinasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de la cutina, componente mayoritario de la cutícula de las plantas (Heinen, 1960; Purdy y Kolattukudy, 1973) y que podrían estar implicadas en la adquisición de carbono para el crecimiento saprofítico (Koller y Parker, 1989).

En cuanto al metabolismo de lípidos y ácidos grasos, se observó un aumento de la expresión de genes relacionados con su biosíntesis como los que codifican una acetil-CoA acetiltransferasa, una ácido lipoico sintetasa y una 3-cetoacil-ACP (proteína transportadora de acilos) reductasa, mientras que la expresión de al menos un gen que codifica una β -cetoacil sintetasa se vio reducida. También se pudo observar una disminución en la expresión de genes que codifican lacasas, enzimas con actividad polifenoloxidasas relacionadas con la síntesis de pigmentos en los conidios, la inducción de cuerpos fructíferos y las interacciones patogénicas con las plantas (Hölker y col., 2002; Kiiskinen y col., 2004).

En relación al metabolismo de ácidos carboxílicos, se observó un aumento de la expresión de genes que codifican las enzimas succinato-semialdehído deshidrogenasa y la 4-aminobutirato transaminasa, ambas implicadas en el metabolismo del ácido γ -aminobutírico (GABA). El GABA se convierte en semialdehído-succínico y éste último en succinato mediante dos reacciones catalizadas por estas dos enzimas mitocondriales.

En la interacción de esta cepa con plantas de tomate también se observó un aumento de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, nucleótidos, obtención de energía y vitaminas, así como de varios genes implicados en detoxificación, regulación, transcripción, traducción y procesos postraduccionales.

Los datos de los *microarrays* también mostraron una disminución de la expresión de tres genes relacionados con hidrofobinas, mientras que sólo uno presentó un aumento de la misma. Las hidrofobinas son proteínas pequeñas localizadas en las superficies externas de las paredes celulares de hifas y conidios, y median las interacciones entre el hongo y el medio ambiente (Seidl-Seiboth y col., 2011). Además, algunas hidrofobinas de *Trichoderma* participan en el desarrollo de las hifas y en la conidiación (Askolin y col., 2005; Mendoza-Mendoza y col., 2007; Muñoz y col., 1997), así como en la colonización de las raíces (Viterbo y Chet, 2006).

2.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE *T. virens* T87 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN INTERACCIÓN CON PLANTAS DE TOMATE

Un total de 383 juegos de sondas mostraron cambios estadísticamente significativos ($FC \geq 2$ y $FDR: 0,25$) en su expresión en la interacción de *T. virens* T87 con plantas de tomate (Figura 9): 205 de ellos (53,5%) aumentaron su expresión

(sobrerregulados) y 178 (46,5%) la disminuyeron (infrarregulados) (Tabla 10). El 65% de los juegos de sondas sobrerregulados procedieron del genoma de *T. virens*, mientras que el 85% de los infrarregulados se debieron a la hibridación con secuencias únicas derivadas de ESTs de 12 cepas de *Trichoderma* depositadas en los *microarrays* (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen del número y porcentaje de juegos de sondas en los *microarrays* HDO de *Trichoderma* que mostraron cambios significativos en el nivel de expresión en *T. virens* T87 en respuesta a la presencia de plantas de tomate.

Juegos de sondas con expresión aumentada (sobrerregulados)		Juegos de sondas con expresión reducida (infrarregulados)	
205 (53,5%)	57 (27,8%) spp.	178 (46,5%)	152 (85,4%) spp.
	15 (7,3%) <i>T. reesei</i>		8 (4,5%) <i>T. reesei</i>
	133 (64,9%) <i>T. virens</i>		18 (10,1%) <i>T. virens</i>

Se asignaron categorías GO a 173 de esos 383 juegos de sondas expresados diferencialmente. Un análisis posterior reveló que 58 categorías GO estaban significativamente sobrerrepresentadas en T87 en presencia de plantas de tomate respecto a la ausencia de planta. Finalmente se identificaron 67 diferentes juegos de sondas y, basándose en grupos similares de juegos de sondas, las 58 categorías GO sobrerrepresentadas se redujeron a seis procesos fisiológicos. La mayor proporción de juegos de sondas sobrerrepresentados correspondió a genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos y en los procesos de comunicación celular (Tabla 11).

Tabla 11. Resumen de los procesos fisiológicos significativamente sobrerrepresentados en *T. virens* T87 en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo en comparación con el medio basal sin planta. Estos procesos fisiológicos agruparon los 67 juegos de sondas identificados dentro de 58 categorías GO significativamente sobrerrepresentadas (valor P corregido < 0,05) en T87 en presencia de plantas de tomate, tras un análisis usando el programa Gene Spring GX.

Proceso fisiológico	Descripción juegos de sondas	Juegos de sondas sobrerregulados	Juegos de sondas infrarregulados
Metabolismo de carbohidratos	GlnNAc-6P deacetilasa	5	
	Celobiohidrolasa	2	
	Quitinasa	2	
	Cutinasa	3	
	α -Galactosidasa	1	1
	β -Galactosidasa	1	1
	Endoglucanasa	1	
	Gln-6P desaminasa	3	
	β -Glucosidasa	1	
	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	1	
Oxidoreductasa (D-lactato deshidrogenasa)			1

	Xilanasa	1	
Metabolismo de lípidos y ácidos grasos	Carbonil reductasa	6	
Metabolismo de aminoácidos	Glutamina sintetasa		1
Transporte	Aminoácidos	2	
	Cationes	1	1
	Transportadores MFS	1	
	Fosfato	4	
Unión	Miosina I (L-aminoácido oxidasa)		3
Comunicación celular	Hidrofobina		24

La relevancia del metabolismo de carbohidratos en la interacción de T87 con plantas de tomate quedó de manifiesto con el aumento de expresión de genes que codifican enzimas con actividad GlnNAc-6P deacetilasa, Gln-6P desaminasa, quitinasa, β -glucosidasa, xilanasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y cutinasa.

Una de las características más importantes de la interacción T87-tomate fue el gran número de juegos de sondas relacionados con hidrofobinas que presentaron reducida su expresión.

Varios genes implicados en el metabolismo lipídico y en el transporte de fosfato, aminoácidos y sustratos generales mostraron una mayor expresión. Por otro lado, se pudo observar una expresión reducida de dos genes que codifican enzimas implicadas en el crecimiento del hongo: una glutamina sintetasa, importante en la asimilación de amonio y en la regulación del metabolismo del nitrógeno, y una D-lactato deshidrogenasa, oxidorreductasa que modula el flujo de piruvato cuando la glucosa es necesaria.

También se vieron infrarregulados genes homólogos a proteínas de unión a miosina I, que juegan un papel importante en el movimiento de las organelas (Lee y col., 2000). Los tres juegos de sondas que se agruparon dentro de la categoría GO de unión a miosina I presentaron homología con genes que codifican una L-aminoácido oxidasa, oxidorreductasa que cataliza la desaminación oxidativa de L-aminoácidos, cuando se comparó su secuencia con las secuencias depositadas en bases de datos.

2.5. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE *Real Time* PCR

Con objeto de confirmar los resultados obtenidos en los *microarrays*, se realizó un análisis de la expresión, mediante *Real Time* PCR, de algunos genes seleccionados. Las cepas *T. hamatum* T7, *T. harzianum* T34 y *T. virens* T87 se cultivaron, durante 20 horas,

en presencia y ausencia de plantas de tomate, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.4 de Materiales y Métodos.

El ARN total, obtenido con el método del TRIZOL® (apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos) se retrotranscribió utilizando oligo dT, tal y como se indica en el apartado 7.2.2.2 de Materiales y Métodos. El ADNc así generado se empleó como molde en las diferentes reacciones de PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos *g6pd*-fw y *g6pd*-rev, para el gen *g6pd*, que codifica una Gln-6P desaminasa; *vir1*-fw y *vir1*-rev, para el gen *vir1*, que codifica una endoquitinasa; *gab*-fw y *gab*-rev, para el gen *gab*, que codifica una 4-aminobutirato transaminasa; *cut*-fw y *cut*-rev, para el gen *cut*, que codifica una cutinasa; *cbhl*-fw y *cbhl*-rev, para el gen *cbhl*, que codifica una celobiohidrolasa I; y *hfbII*-fw y *hfbII*-rev, para el gen *hfbII*, que codifica una hidrofobina II. Como control interno se utilizó el gen que codifica la β -tubulina, usando los oligonucleótidos *tub*-fw y *tub*-rev. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10.

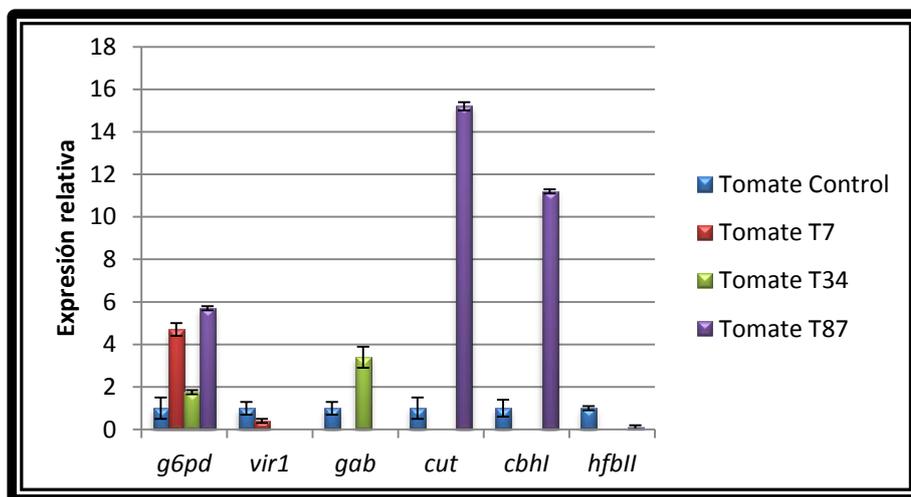


Figura 10. Análisis de la expresión relativa de genes seleccionados mediante *Real Time* PCR. Las cepas *T. hamatum* T7, *T. harzianum* T34 y *T. virens* T87 se cultivaron en un medio basal en presencia o ausencia de plantas de tomate, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Como control interno se utilizó el gen de la β -tubulina. Como condición basal se utilizó el nivel de expresión detectado para cada uno de los genes en la cepa de *Trichoderma* correspondiente en ausencia de plantas de tomate. Se tomó como valor de la condición basal $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$. Abreviaturas de los genes: *g6pd*, Gln-6P desaminasa (XP_001657190); *vir1*, endoquitinasa VIR1 (BAB40593); *gab*, 4-aminobutirato transaminasa (EFQ31201); *cut*, cutinasa (ADQ27862); *cbhl*, celobiohidrolasa I (ACF93800); y *hfbII*, hidrofobina II (ABS59374).

El gen *g6pd* aumentó su expresión en las tres interacciones *Trichoderma*-tomate. También se observó un aumento de expresión del gen que codifica la 4-aminobutirato transaminasa en la interacción T34-tomate, y de los genes *cut* y *cbhl* en la interacción de T87 con la planta; mientras que disminuyó la expresión del gen que codifica la quitinasa VIR1 en la interacción T7-tomate y del gen *hfbII* en la interacción de T87 con la planta en comparación con sus controles (Figura 10). Todos estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos en los *microarrays*.

DISCUSIÓN

Algunas especies del género *Trichoderma* se han utilizado como agentes de biocontrol debido a su capacidad para suprimir enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos (Howell, 2003). El antagonismo de *Trichoderma* se ha relacionado con mecanismos de acción como la producción de antibióticos (Vinale y col., 2006) y/o enzimas hidrolíticas (Benítez y col., 2004) y la competencia por los nutrientes (Elad, 2000). Además, estos hongos también son capaces de interactuar con las plantas, induciendo resistencia a estreses bióticos y abióticos, y promoviendo el crecimiento de las mismas (Shoresh y col., 2010).

Se han utilizado diferentes estrategias basadas en las “ómicas” para entender la base biológica de los mecanismos de actuación de *Trichoderma* (Lorito y col., 2010). Algunos autores han estudiado cómo responden las plantas ante la presencia de una cepa de *Trichoderma* que coloniza la raíz (Alfano y col., 2007; Brotman y col., 2013), pero esta asociación ha sido menos estudiada desde el punto de vista del hongo. Se han usado *macroarrays* para estudiar la expresión de genes de cuatro especies de *Trichoderma* durante su interacción con plántulas de cacao (Bailey y col., 2006), y de *T. harzianum* durante la colonización temprana de raíces de tomate (Chacón y col., 2007), pero en estos trabajos el número de genes analizados fue bastante bajo. En un estudio más reciente, se diseñó un *microarray* HDO para analizar la expresión de genes de *T. harzianum* en diferentes condiciones de crecimiento, dentro de las que se incluyó la colonización de raíces de tomate (Samoslki y col., 2009).

Inicialmente, en este trabajo se estudió el efecto que provocaban 10 cepas de *Trichoderma* en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate mediante un ensayo de interacción *in vitro*. Los efectos más beneficiosos sobre las raíces de las plántulas se observaron con las cepas *T. hamatum* T7 y *T. harzianum* T34. La capacidad de la cepa T34 para promover el crecimiento de plantas de tabaco y de tomate, incrementando el área de la hoja y la formación de raíces laterales ya había sido observado en un estudio *in vitro* previo (Chacón y col., 2007).

Por otra parte, T87 fue la cepa que produjo los efectos más perjudiciales en las raíces de tomate y, además, las plantas presentaron una menor área foliar y un menor número de hojas verdaderas que los controles. Estos resultados están en desacuerdo con trabajos anteriores que demuestran que esta cepa es capaz de promover el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* mediante la producción de compuestos de tipo auxina (Contreras-Cornejo y col., 2009), que es capaz de inducir mayores tasas fotosintéticas y capaz de producir un aumento sistémico de la absorción de dióxido de carbono (CO₂) en hojas (Vargas y col., 2009). Se ha comprobado que peptaiboles de T87 elicitan defensas sistémicas frente a patógenos de hoja en pepino (Viterbo y col., 2007), y que el elicitor Sm1 secretado por esta misma cepa es capaz de estimular los mecanismos de defensa en maíz (Djonović y col., 2007). Se sabe que el diálogo entre

Trichoderma y las plantas es dinámico y depende de muchos factores (Hermosa y col., 2012), por lo que los efectos negativos observados en la interacción T87-tomate se podrían deber a la concentración del hongo, al tipo de planta, el estado de desarrollo de la misma o al tiempo de interacción. Además, se ha descrito que T87 es una cepa “Q” de *T. virens*, capaz de producir un metabolito fitotóxico denominado gliotoxina bajo diversas condiciones de cultivo (Howell, 2006), que podría ser el responsable del efecto negativo de T87 sobre el desarrollo de las plantas de tomate, aunque es indispensable para la capacidad micoparasítica de esta cepa (Vargas y col., 2014).

Por otro lado, se realizó un ensayo de interacción *in vivo* de T7, T34 y T87 con plantas de tomate. Los resultados también mostraron que la inoculación de las plantas con la cepa T87 reducía significativamente la longitud del tallo y la raíz, mientras que el crecimiento no se veía afectado por las cepas T7 y T34. Recientemente se ha publicado que el fondo genético de la planta afecta a la interacción *Trichoderma*-tomate y que el tratamiento con agentes de biocontrol puede ejercer efectos negativos en algunos genotipos de tomate (Tucci y col., 2011). Además, existen estudios que parecen indicar que los tratamientos de plantas con cepas de *Trichoderma* presentan muchas más ventajas cuando las plantas están sometidas a condiciones de estrés (Mastouri y col., 2010).

Las plantas se benefician de la interacción simbiótica con *Trichoderma* ya que aumentan el potencial de crecimiento, la resistencia a enfermedades y la tolerancia a estreses abióticos (Hermosa y col., 2012), mientras que *Trichoderma* utiliza los nutrientes que le proporcionan las plantas. Se ha demostrado que la sacarosa derivada de las plantas es un nutriente importante para *Trichoderma* y que, además, participa en el control de la colonización de las raíces (Vargas y col., 2009). Sin embargo, se sabe poco acerca de los cambios que se producen en el transcriptoma de *Trichoderma* en interacción con la planta. Por ello, en este trabajo se han estudiado los efectos que provoca la presencia de plantas de tomate en la expresión génica global de las cepas T7, T34 y T87 de *Trichoderma* mediante la hibridación de *microarrays* HDO.

Solamente seis juegos de sondas se expresaron diferencialmente en común en las tres cepas de *Trichoderma* en interacción con tomate. Independientemente de los efectos provocados en las plantas por las distintas cepas de *Trichoderma*, el metabolismo de carbohidratos y el transporte fueron los procesos más sobrerrepresentados, hecho que podría estar indicando una adaptación activa del hongo a la rizosfera. En un estudio anterior con diferentes cepas endofíticas de *Trichoderma* también se observó la inducción de ESTs correspondientes a enzimas que participan potencialmente en el soporte nutricional de *Trichoderma ovalisporum* y *T. hamatum* en la interacción con plántulas de cacao (Bailey y col., 2006).

T. hamatum T7 y *T. harzianum* T34 ejercieron efectos beneficiosos sobre el desarrollo de plántulas de tomate. Sin embargo, solamente siete juegos de sondas se expresaron diferencialmente en ambas cepas. Uno de ellos correspondió a un gen que codifica una proteína que en el genoma humano se conoce como proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), también llamada fortalina o P23, que participa en la proliferación mitótica durante los estadios tempranos de la diferenciación celular (Felts y Toft, 2003). La sobreexpresión de esta proteína en células humanas provoca una elongación celular similar al crecimiento de las hifas en hongos. En un estudio previo también se observó la inducción del gen que codifica una proteína homóloga a TCTP en *T. harzianum* T34 en contacto con raíces de tomate (Samolski y col., 2009). Estos resultados sugieren que la proteína P23 podría estar relacionada con el crecimiento de las hifas y con el efecto beneficioso ejercido por T7 y T34 sobre el crecimiento de las plantas tras la colonización de las raíces.

Otra característica común entre las cepas T7 y T34, en interacción con plantas de tomate, fue la sobrerrepresentación de una actividad hexoquinasa. Sin embargo, las diferencias en el desarrollo de las plantas observadas en los ensayos biológicos entre estas dos cepas y T87 no pueden atribuirse sólo a esta actividad.

T34 y T87 fueron las cepas que presentaron un mayor número de juegos de sondas expresados diferencialmente en común. Esto podría deberse a la proximidad filogenética entre ambas, aunque se observaron efectos muy distintos en su interacción con la planta en los ensayo *in vitro* e *in vivo*.

Este estudio transcriptómico podría tener las limitaciones de que varios juegos de sondas podrían corresponder a un mismo gen, que sólo se pudo asignar categorías GO aproximadamente al 50% de los juegos de sondas con un cambio de expresión significativa, que los cambios de expresión se analizaron en condiciones de cultivo hidropónico, que los genes cuya expresión cambia rápidamente en la interacción *Trichoderma*-tomate pueden no ser detectados. Sin embargo, también se puede destacar que los *chips* utilizados contenían 374.824 juegos de sondas que representan un total de 34.138 transcritos génicos procedentes de 14 cepas de *Trichoderma*. Aunque en estos *microarrays* no se incluyeron genes de *T. hamatum*, el transcriptoma de *Trichoderma* está bien representado, ya que se ha estimado que los genomas ya secuenciados de *Trichoderma* contienen 9.143-12.518 genes predichos (Martínez y col., 2008; Kubicek y col., 2011). Se obtuvieron además resultados similares en las tres réplicas biológicas realizadas para cada condición experimental, lo que indica una alta calidad de las muestras y un alto grado de comparabilidad. Por otro lado, los resultados de *Real Time* PCR confirmaron los datos obtenidos de los *microarrays*. Además, se utilizó un valor P corregido < 0,05 para identificar los procesos biológicos

sobrerrepresentados dentro de los juegos de sondas expresados diferencialmente (FDR: 0,25) en cada muestra.

T. hamatum T7 fue la cepa que presentó el menor número de juegos de sondas expresados diferencialmente de las tres interacciones *Trichoderma*-tomate analizadas. Ya que en los *microarrays* no estaban incluidos genes de *T. hamatum*, se podría pensar que parte de los cambios producidos en su transcriptoma en interacción con la planta no se iban a detectar. Sin embargo, la mayoría de los juegos de sondas expresados diferencialmente en esta cepa (68 y 74% de los sobrerregulados e infrarregulados, respectivamente) se debieron a la hibridación con secuencias únicas basadas en ESTs de 12 cepas de *Trichoderma*. Estos porcentajes fueron más altos que los obtenidos para *T. harzianum* T34 (65 y 50% de los juegos de sondas sobrerregulados e infrarregulados, respectivamente), cepa representada por 3.826 transcritos basados en ESTs en los *chips*, por lo que podemos considerar estos *microarrays* como una herramienta adecuada para estudiar la expresión génica en *T. hamatum* T7.

Los diferentes juegos de sondas sobrerrepresentados en *T. hamatum* T7 se agruparon en dos procesos fisiológicos: metabolismo de carbohidratos y transporte. Esta cepa fue la que presentó el mayor número de juegos de sondas expresados diferencialmente relacionados con quitinasas en interacción con la planta, viéndose aumentada la expresión de genes homólogos a las quitinasas pertenecientes a la clase III de la familia 18 de las glicosil hidrolasas (grupo filogenético B), y reducida la expresión del gen que codifica la quitinasa VIR1 de la clase V de la misma familia (grupo filogenético A). Las quitinasas del grupo A se han asociado con autólisis micelial (Brunner y col., 2003), por lo que podría esperarse una menor expresión de genes que codifican esta clase de proteínas en la interacción temprana *Trichoderma*-planta. Por otro lado, las quitinasas del grupo B, con un dominio típico de unión a celulosa, como las quitinasas 18-13 y 18-17, se han relacionado con el reconocimiento y la unión *Trichoderma*-planta (Seidl y col., 2005), por lo que un aumento en su expresión podría estar relacionado con el efecto beneficioso de la cepa T7 sobre las plantas. En *Trichoderma asperelloides*, se ha identificado un péptido con un dominio de unión a celulosa como MAMP capaz de inducir respuestas de defensa en pepino (Brotman y col., 2008).

Las quitinasas también están involucradas en el metabolismo de la quitina, un polisacárido que no está presente en las raíces de las plantas. Sin embargo, se sabe que sólo algunos genes de quitinasas se inducen por quitina en *Trichoderma*, lo que sugiere que componentes de la pared celular que no están relacionados con la quitina pueden actuar como inductores (Gruber y col., 2011). Esto está en consonancia con el aumento de expresión de genes que codifican proteínas con actividades GlnNAc-6P deacetilasa, Gln-6P desaminasa y quitinasa en la interacción hidropónica *Trichoderma*-

planta, lo que podría indicar que los quitooligómeros, capaces de disparar las respuestas de defensa de la planta (Woo y col., 2006), podrían ser generados por el sistema quitinolítico de *Trichoderma* sin necesidad de una inducción por quitina.

Se podría pensar que sería necesario un aumento de expresión de genes relacionados con procesos de transporte para facilitar el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta. Sin embargo, se observó una disminución de la expresión de genes transportadores MFS en T7 en interacción con plantas de tomate, lo que podría indicar que tras la unión de las hifas a la raíz y la colonización, la captación de nutrientes por parte de *Trichoderma*, al menos en estadíos tempranos, es limitada; o que T7 mantiene un metabolismo bajo durante la colonización de las raíces.

Los diferentes juegos de sondas sobrerrepresentados en *T. harzianum* T34 se agruparon en varios procesos fisiológicos, siendo el metabolismo de carbohidratos y el transporte los más afectados.

El aumento de expresión de diversos juegos de sondas relacionados con proteínas implicadas en procesos de transporte en la interacción T34–tomate coincide con los resultados obtenidos en otros estudios en los que también aumentó la expresión de genes involucrados en el transporte de azúcares y aminoácidos (Chacón y col., 2007), y de genes transportadores de proteínas mitocondriales (Samolski y col., 2009).

T. harzianum T34 fue la cepa que presentó el mayor número de genes sobrerregulados relacionados con el metabolismo de carbohidratos, con el soporte nutricional del hongo, y con funciones básicas celulares de las tres interacciones estudiadas en este trabajo. Estos datos apuntan a una activación de la glucolisis/gluconeogénesis, del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), de la ruta de las pentosas fosfato, y de otros procesos relacionados con la generación de energía e implicados en la síntesis de la pared celular. Este hecho parece indicar que el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta se ve incrementado durante la interacción T34-tomate.

Las cutinasas son enzimas que hidrolizan la cutina presente en la cutícula de las plantas, ausente en las raíces. Sin embargo, varios juegos de sondas relacionados con cutinasas aumentaron su expresión en la interacción de T34 con las raíces de tomate. Esto podría indicar una regulación global del sistema hidrolítico de *Trichoderma* para asegurar la disponibilidad de carbono durante el crecimiento saprofito. Además, se ha descrito que la xilanasas EIX1 dispara respuestas hipersensibles y otras respuestas de defensa de la planta independientemente de su actividad xilanolítica (Rotblat y col., 2002).

Al igual que en otros estudios (Chacón y col., 2007; Samolski y col., 2009), también se observó en T34 un aumento de expresión de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, nucleótidos, energía y vitaminas, así como de genes implicados en detoxificación, regulación, señalización, transcripción, traducción y procesos postraduccionales. Aunque los genes sobrerregulados fueron diferentes en los distintos estudios, los resultados obtenidos confirman modificaciones en todos estos procesos fisiológicos en los estadios iniciales de la interacción T34-tomate para atender a la alta demanda de energía metabólica por parte del hongo.

También se observó un aumento de expresión de genes que codifican una acetil-CoA acetiltransferasa, una ácido lipoico sintetasa y una 3-cetoacil-ACP (proteína transportadora de acilos) reductasa. Estos datos coinciden con la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de lípidos y el catabolismo observado en la interacción T34-tomate en estudios anteriores (Chacón y col., 2007).

La sobrerregulación de genes que codifican las enzimas succinato-semialdehído deshidrogenasa y 4-aminobutirato transaminasa observada en esta interacción T34-tomate ya había sido descrita previamente en las interacciones *C. fulvum*-tomate y *Pseudomonas-Arabidopsis* (Solomon y Oliver, 2002; Park y col., 2010), y en la simbiosis de *Rhizobium leguminosarum* con plantas de guisante (Prell y col., 2002). Estos autores sugieren que los microorganismos pueden alterar la fisiología de la planta durante las interacciones, dando lugar a un aumento de la producción de GABA, que puede jugar un papel señalizador en la inducción de las enzimas fúngicas responsables de su degradación. Según esto, T34 podría usar como nutriente el GABA de la planta.

Respecto a la interacción de *T. virens* T87 con plantas de tomate, se podría esperar que la mayoría de los juegos de sondas expresados diferencialmente procedieran del genoma de *T. virens*. Esto fue así para los juegos de sondas sobrerregulados; sin embargo, el 85% de los infrarregulados se debieron a la hibridación con secuencias únicas derivadas de ESTs de 12 cepas de *Trichoderma* depositadas en los *microarrays*, lo que indicaría un alto grado de hibridación cruzada con juegos de sondas heterólogos. Este hecho se podría explicar si tenemos en cuenta que en el diseño de los *microarrays* también se incluyeron 991 ESTs de *T. virens* T59.

Los diferentes juegos de sondas sobrerrepresentados en T87 en interacción con la planta se agruparon en seis procesos fisiológicos siendo el metabolismo de carbohidratos y la comunicación celular los más afectados.

El aumento de expresión de genes que codifican enzimas como GlnNAc-6P deacetilasas, Gln-6P desaminasas y quitinasas se observó en las cepas T7, T34 y T87 en

su interacción con plantas de tomate, mientras que la sobrerregulación de genes que codifican glucosidasas, xilanasas, glicerol-3P deshidrogenasas y cutinasas solamente se observó en las cepas T34 y T87.

Estudios previos han demostrado el aumento de expresión de genes que codifican hidrofobinas, tanto en *T. reesei* en medios conteniendo polisacáridos de plantas (Nakari-Setälä y col., 1997), como en *T. atroviride* en interacción con raíces de judía (Marra y col., 2006), como en *T. harzianum* en interacción con raíces de tomate (Samolski y col., 2009). Sin embargo, una de las características más relevantes de la interacción T87-tomate fue el alto número de juegos de sondas infrarregulados relacionados con este tipo de genes. También se ha publicado la regulación diferencial de 10 genes que codifican hidrofobinas de clase II (Mikus y col., 2009). Si la infrarregulación de estos genes observada en la interacción T87-tomate se debe a la presencia de la planta o si beneficia a la colonización de las raíces por parte del hongo todavía está por demostrar, aunque es posible que esté implicada en los efectos negativos que causó esta cepa en las plántulas de tomate a nivel de elongación de las raíces y del desarrollo de raíces laterales.

El aumento de expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico y en el transporte de fosfato, aminoácidos y sustratos generales podría facilitar el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta y la reorganización de las membranas y la pared celular del hongo (Chacón y col., 2007).

Es difícil entender el papel que juega la infrarregulación de genes implicados en el metabolismo de aminoácidos, pero la menor expresión de genes que codifican una glutamina sintetasa y una L-aminoácido oxidasa podría indicar una disponibilidad de nitrógeno suficiente o un metabolismo de *Trichoderma* limitado en su interacción con la planta. En bacterias, la relación 1,6-bifosfato/fosfato puede regular las lactato deshidrogenasas (van Niel y col., 2004). La disminución de expresión de una D-lactato deshidrogenasa en T87 se podría deber a la acumulación de fructosa 6-fosfato obtenida tras la activación de la Gln-6P desaminasa observada en la interacción T87-tomate.

Los resultados obtenidos, tomados de forma global, indican una activación significativa del metabolismo de carbohidratos y de los procesos de transporte en las tres cepas de *Trichoderma* estudiadas en su interacción temprana con plantas de tomate.

CÁPITULO 2

RESULTADOS

1. EFECTO DE *T. parareesei* T6 EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE PLANTAS DE TOMATE

Para evaluar el efecto de *T. parareesei* T6 sobre el desarrollo de plantas de tomate se realizó un ensayo de interacción *in vitro*, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.2 de Materiales y Métodos. Este ensayo mostró que *T. parareesei* T6 favorecía el desarrollo de las raíces de las plántulas de tomate, aumentando tanto el número como la longitud de las raíces laterales (Figura 11).

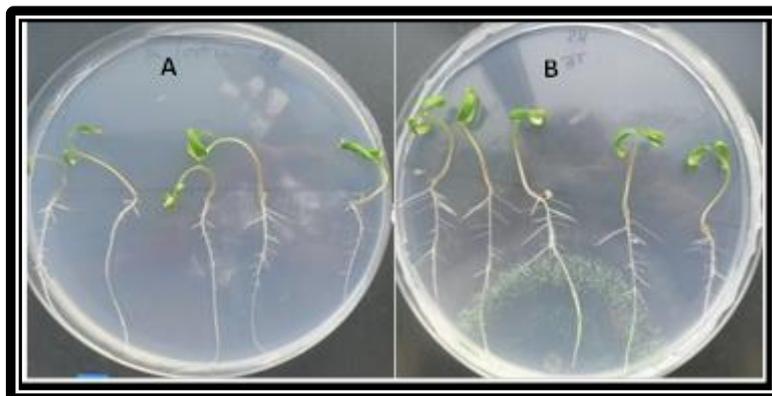


Figura 11. Efecto de *T. parareesei* T6 en plántulas de tomate. Plántulas de tomate germinadas y crecidas durante 3 días en medio MS, suplementado con sacarosa al 1%, agar al 0,8%, pH 5,7, se inocularon con: (A) agua o (B) *T. parareesei* T6. Las fotografías se tomaron 4 días después de la inoculación con 1×10^6 esporas de T6 o con agua en el caso de las placas control.

Posteriormente, se realizó un ensayo de interacción *in vivo* sembrando semillas de tomate recubiertas con esporas de la cepa T6 en macetas conteniendo suelo comercial, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.3 de Materiales y Métodos. Al cabo de 4 semanas se evaluó el efecto de T6 en el crecimiento de las plantas de tomate, y se pudo observar que no había diferencias significativas en cuanto a longitud de tallo y de raíz de las plantas cuando se compararon las dos condiciones ensayadas (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto de la cepa *T. parareesei* T6 en el crecimiento de plantas de tomate. Las longitudes de raíces y tallos corresponden a plantas de 4 semanas sin tratar (control), o tratadas con la cepa T6. Cada valor es la media de 28 medidas \pm su desviación estándar. Los valores no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Fisher.

Cepa	Longitud de raíz (cm)	Longitud del tallo (cm)
Control	$25,75 \pm 3,54^a$	$27,45 \pm 3,56^a$
T6	$25,85 \pm 3,90^a$	$28,14 \pm 2,89^a$

2. GENES DE *T. parareesei* T6 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A PLANTAS DE TOMATE

2.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE *T. parareesei* T6 EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A PLANTAS DE TOMATE

Con objeto de estudiar los cambios fisiológicos y bioquímicos producidos en *T. parareesei* T6 tras 20 horas de interacción con plantas de tomate, se llevó a cabo un análisis transcriptómico utilizando *microarrays* de *Trichoderma* HDO, diseñados tal y como se describe en el apartado 8.2.1 de Materiales y Métodos. Estos *microarrays* se hibridaron con ADNc de T6 obtenido tras cultivar la cepa en presencia y ausencia de plantas de tomate. El diseño experimental fue similar al descrito para la interacción de las cepas *T. hamatum* T7, *T. harzianum* T34 y *T. virens* T87 con plantas de tomate y aparece recogido en el apartado 2 de Resultados del capítulo anterior.

Los perfiles de expresión, obtenidos tras el análisis de los *microarrays*, de T6 en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo en comparación con el medio basal sin plantas, fueron similares en las tres réplicas biológicas realizadas; y se compararon con los obtenidos tras la interacción de T7, T34 y T87 con plantas de tomate en las mismas condiciones experimentales (capítulo 1 de esta Tesis Doctoral).

Un total de 250 juegos de sondas (0,73%) presentaron cambios significativos, de al menos dos veces de expresión ($FC \geq 2$ y FDR: 0,10) en T6 tras 20 horas de interacción con la planta. De ellos, 33 aumentaron su expresión (sobrerregulados) y 217 la disminuyeron (infrarregulados). La mayoría de estos juegos de sondas expresados diferencialmente (57,6% y 80,6% de los sobrerregulados e infrarregulados, respectivamente) procedieron del genoma de *T. reesei*.

Se asignaron categorías GO a 132 de esos 250 juegos de sondas, de los cuales 18 fueron sobrerregulados y 114 infrarregulados. Un análisis posterior reveló que no había categorías GO significativamente sobrerrepresentadas en T6 en presencia de plantas de tomate respecto a la cepa sin planta. Por este motivo, todos los juegos de sondas expresados diferencialmente se analizaron de forma independiente y a continuación se agruparon en varios procesos fisiológicos, siendo el metabolismo de carbohidratos y el transporte los procesos más afectados (Tabla 13).

Tabla 13. Resumen de los procesos fisiológicos alterados en *T. parareesei* T6 en respuesta a la presencia de plantas de tomate en el medio de cultivo en comparación con el medio basal sin planta. Estos procesos fisiológicos agruparon 250 juegos de sondas, 33 sobrerregulados y 217 infrarregulados, cuya descripción se basó en su homología con secuencias presentes en la base de datos UNIPROT empleando el algoritmo BLAST considerando un valor $E < 10^{-5}$.

Proceso fisiológico	Descripción juegos de sondas	Juegos de sondas sobrerregulados	Juegos de sondas infrarregulados
Metabolismo de carbohidratos	Poligalacturonasa	1	1
	Glucano 1,4- α -glucosidasa	1	
	β -galactosidasa		2
	Fosfoglicerato mutasa		16
	Glicósido hidrolasa (quitinasa)		1
	Alginato-liasa		1
	β -manosidasa		1
	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta		3
	Glucosa deshidrogenasa		1
	6-fosfofructo-2-quinasa		1
	2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa		1
Metabolismo de lípidos y ácidos grasos	Fosfolipasa	1	1
	Fosfatidilserina descarboxilasa		3
	Diterpeno sintetasa		1
	Esterasa/lipasa		1
	Acyl-CoA sintetasa		1
Metabolismo de aminoácidos	Metiltransferasa dependiente de S-adenosil metionina		2
	Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos		1
	Homoserina deshidrogenasa		1
	Aspartato quinasa		1
Metabolismo de proteínas	Componente del proteasoma (endopeptidasa)		1
	Inhibidor de endopeptidasa de tipo serina		1
Metabolismo de ácidos nucleicos y nucleótidos	Proteína de la biosíntesis de pirimidina		2
	Oxidoreductasa 2-nitropropano dioxigenasa		1
	Fosforribosil transferasa		1
	Endorribonucleasa L-PSP		1
	Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolasa		1
Metabolismo de vitaminas	Proteína de la biosíntesis de tiamina		1
	Proteína de la biosíntesis de vitamina b12		1
	C-14 esteroil reductasa		1
Metabolismo secundario	Espermidina sintetasa quimérica/sacaropina deshidrogenasa	1	
	Quinato deshidrogenasa	1	
	Péptido sintetasa no ribosomal	1	1
	Prenil transferasa		1

Resultados Capítulo 2

	Isoflavona reductasa		3
	Longiborneol sintetasa		1
Metabolismo energético	Aldehído deshidrogenasa	1	
	NADH:flavin oxidorreductasa		1
	Deshidrogenasa dependiente de flavin mononucleótido		1
	Flavin oxidorreductasa		1
	Alcohol deshidrogenasa		1
	GTPasa tipo dinamina		2
	ATPasa		1
	Oxidorreductasa dependiente de flavin adenin dinucleótido		1
	Aldo-ceto reductasa		1
Metabolismo inorgánico	Reductasa férrica		3
Metabolismo de compuestos de nitrógeno	Ureasa UreD		1
Transporte	Transportadores MFS	2	16
	Transportador ABC	2	
	Transportador de acuaporina		1
	Transportador de cobre		2
	Canal Hemolisina III		2
Detoxificación	Citocromo-c oxidasa		1
	Citocromo P450 monooxigenasa		6
	ADP-ribosa pirofosfatasa		1
	Cloroperoxidasa		1
	Enzima activadora de formaldehído dependiente de glutatión		1
	Glutatión S-transferasa		1
	Monooxigenasa de unión a flavin adenin dinucleótido		2
	β -lactamasa		1
	Halogenasa dependiente de flavina		1
	Catalasa/peroxidasa		1
	Esteroides monooxigenasa		1
	Agmatina deiminasa		1
	Proteína con dominio RTA1		1
Fosfatasa ácida		2	
Modificaciones Postraduccionales	Complejo regulador del proteasoma 26S	1	1
	Disulfuro isomerasa		1
	Glutamato carboxipeptidasa		1
	Tiorredoxina		1
	Tripeptidil-peptidasa		1
	Proteasa aspártica		1
	Histona-lisina N-metiltransferasa		1
	Proteína con dominio S-adenosil metionina		1
Secreción	Translocasa mitocondrial	1	
Adhesión	Fasciclina		1

Comunicación celular	Hidrofobina		1
Pared celular y membranas	Proteína integral de membrana	2	1
	Proteína de pared celular		1
Señalización	Proteína ankirina	2	1
	Proteína de señalización relacionada con celulosa	1	
	Proteína envuelta en señalización mediada por proteínas G		1
	Receptor acoplado a proteína G		1
	Caseína quinasa II/serina/treonina proteína quinasa		1
	Caseína quinasa I, subunidad delta		1
	Regulador de la señalización de proteínas G		1
Regulación	Activador de fosfotirosil fosfatasa		1
Replicación	Complejo de replicación de ADN		1
Transcripción y traducción (síntesis de proteínas)	Factores de transcripción	4	11
	Factor de iniciación de la traducción 2 β	1	
	ARN polimerasa II ADN dependiente		1
	ARN polimerasa III ADN dirigida		1
	tARNHis guanilil transferasa		1
	Proteína de unión a ácidos nucleicos dependiente de GTP		1
Reparación	Proteína con dominio Smr		1
Función desconocida		10	68

En presencia de plantas de tomate, se pudo observar una menor expresión de un gran número de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos y en el soporte nutricional del hongo (como genes que codifican β -galactosidasas, alginatoliasas, β -manosidasas, etc.), así como de genes relacionados con funciones básicas celulares (como los que codifican fosfoglicerato mutasas, glucosa deshidrogenasas, 6-fosfofructo-2-quinasas, 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasas, etc.). Esto indica que el metabolismo del hongo se encuentra disminuido en la cepa T6 a las 20 horas de interacción con plantas de tomate.

Con respecto a los procesos de transporte, aunque se pudo observar la sobrerregulación de dos juegos de sondas relacionados con transportadores ABC y dos más relacionados con transportadores MFS, también se detectó la infrarregulación de otros 16 juegos de sondas correspondientes a transportadores MFS. Además, se observó una menor expresión de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos y lípidos, de aminoácidos y proteínas, de nucleótidos y ácidos nucleicos, de vitaminas, y de compuestos inorgánicos y de nitrógeno; así como de genes implicados en el metabolismo energético y en el metabolismo secundario, y genes implicados en

diversos procesos celulares (como detoxificación, modificación postraduccional, adherencia, secreción, comunicación celular, etc.), señalización y regulación, y mantenimiento de la información y procesamiento (como genes de replicación, transcripción, traducción o reparación).

Algunos de los 18 juegos de sondas sobrerregulados a los que se les había asignado categoría GO se relacionaron con enzimas implicadas en el proceso de colonización (ej. una endopoligalacturonasa) (Morán-Díez y col., 2009), en la biosíntesis de metabolitos secundarios o sus precursores (ej. una sacaropina deshidrogenasa, una péptido sintetasa no ribosómica y una quinato deshidrogenasa) (Strieker y col., 2010), en la adquisición de nutrientes (ej. una glucano α -1,4-glucosidasa y una fosfolipasa), y en la elongación del tubo germinativo y el crecimiento de las hifas (ej. sacaropina deshidrogenasa) (Jin y col., 2002).

2.2. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE *Real Time* PCR

Con objeto de confirmar los resultados obtenidos en los *microarrays*, se realizó un análisis de expresión, mediante *Real Time* PCR, de algunos genes seleccionados. La cepa *T. parareesei* T6 se cultivó durante 20 horas, en presencia y ausencia de plantas de tomate, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.4 de Materiales y Métodos.

El ARN total, obtenido con el método del TRIZOL® (apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos) se retrotranscribió utilizando oligo dT, tal y como se indica en el apartado 7.2.2.2.2 de Materiales y Métodos. El ADNc así generado se empleó como molde en las diferentes reacciones de PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos ABC-fw2 y ABC-rev2, para el gen que codifica un transportador ABC; alcohol DH-fw y alcohol DH-rev, para el gen que codifica una alcohol deshidrogenasa; CSRP-fw y CSRP-rev, para el gen que codifica una proteína de señalización relacionada con celulosa; DH red-fw2 y DH red-rev2, para el gen que codifica una deshidrogenasa/reductasa; las parejas MFS-fw y MFS-rev, y MAT-fw y MAT-rev, para dos genes que codifican transportadores de sustratos generales; PG mutasa-fw y PG mutasa-rev, para el gen que codifica una fosfoglicerato mutasa; monooxigenasa-fw y monooxigenasa-rev, para el gen que codifica una esteroide monooxigenasa; y p450-fw y p450-rev, para el gen que codifica una citocromo P450 monooxigenasa. Como control interno se utilizó el gen que codifica la β -tubulina, usando los oligonucleótidos tub-fw y tub-rev. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

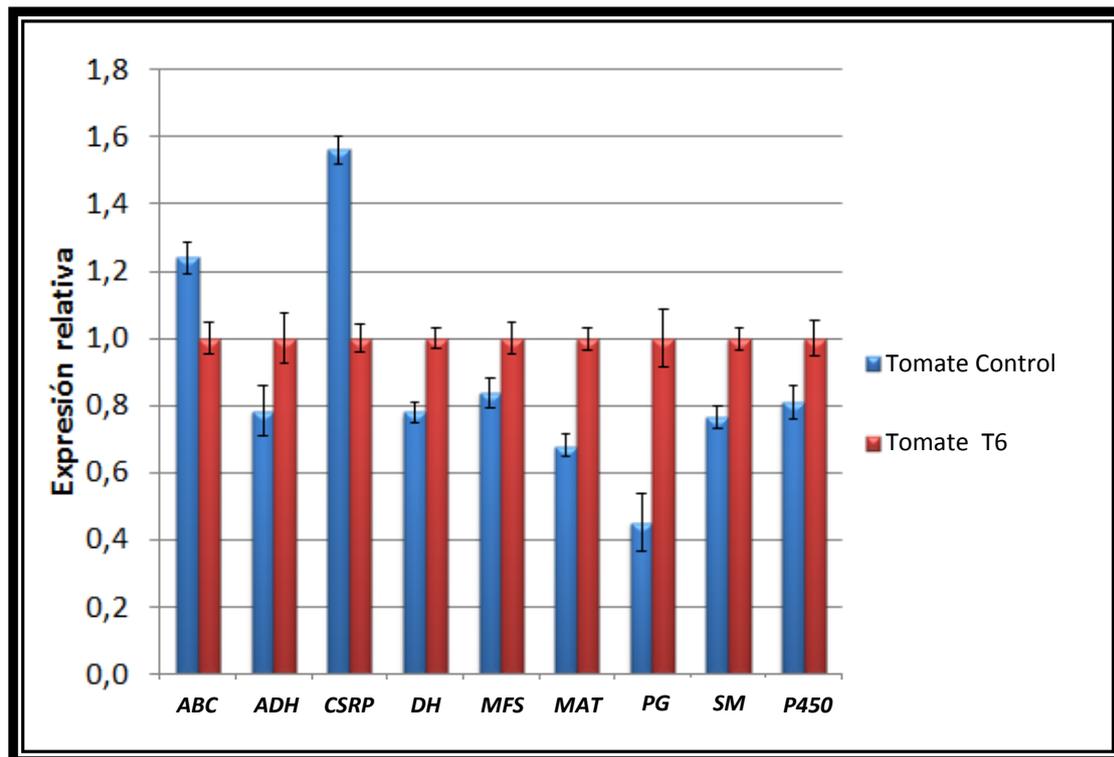


Figura 12. Análisis de la expresión relativa de genes seleccionados mediante *Real Time* PCR. La cepa *T. parareesei* T6, se cultivó en un medio basal en presencia o ausencia de plantas de tomate, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Como control interno se utilizó el gen de la β -tubulina. Como condición basal se utilizó el nivel de expresión detectado para cada uno de los genes en la cepa T6 en ausencia de plantas de tomate. Se tomó como valor de la condición basal $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$. Abreviaturas de los genes: ABC, transportador ABC; ADH, alcohol deshidrogenasa; CSRP, gen de señalización relacionado con celulosa; DH, deshidrogenasa/reductasa; MFS y MAT, dos transportadores; PG, fosfoglicerato mutasa; SM, esteroide monooxigenasa; y P450, citocromo P450 monooxigenasa.

Los genes que codifican el transportador ABC y la proteína de señalización relacionada con celulosa aumentaron su expresión en la interacción de T6 con plantas de tomate, mientras que el resto de los genes analizados disminuyeron su expresión. Estos resultados se correlacionan con los datos obtenidos de los *microarrays*.

3. EFECTO DE *T. parareesei* T6 EN LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE

Con objeto de conocer si la respuesta de las plantas de tomate a *T. parareesei* T6 implicaba una activación diferencial de genes relacionados con la defensa sistémica, se analizó la expresión de genes marcadores representativos de las rutas de señalización de SA (isocorismato sintasa 1 [*ICS1*] y proteína relacionada con patogénesis 1 [*PR1*]), de JA (lipooxigenasa 1 [*LOX1*]) y de ET (proteína insensible al ET 2 [*EIN2*]) mediante *Real Time* PCR. El material vegetal se obtuvo a partir de cultivos en

placa y en maceta realizados tal y como se describe en los apartados 4.1.2.2 y 4.1.2.3 de Materiales y Métodos, respectivamente.

El ARN total, obtenido con el método del TRIZOL® (apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos) se retrotranscribió utilizando oligo dT, tal y como se indica en el apartado 7.2.2.2.2 de Materiales y Métodos. El ADNc así generado se empleó como molde en las diferentes reacciones de PCR. Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos ICS1-fw y ICS1-rev, PR1-fw y PR1-rev, LOX1-fw y LOX1-rev, y EIN2-fw y EIN2-rev, para los genes marcadores *ICS1*, *PR1*, *LOX1* y *EIN2*, respectivamente. Como control interno se utilizó el gen que codifica la actina, usando los oligonucleótidos Actina-fw y Actina-rev.

La expresión de los genes marcadores en plántulas de tomate obtenidas del ensayo *in vitro* realizado en placa se muestra en la Figura 13. En comparación con el control, las plántulas de tomate inoculadas con la cepa T6 mostraron un incremento significativo en los niveles de expresión de los genes *EIN2* y *LOX1*, mientras que el gen *PR-1*, de respuesta a SA, presentó una disminución en su expresión y el gen *ICS1*, implicado en la biosíntesis de SA, no se vio afectado significativamente. Estos resultados indican que las rutas de señalización del JA y del ET están inducidas 6 días después de la inoculación de plántulas de tomate con T6, lo que indica una respuesta de ISR provocada por *T. parareesei*.

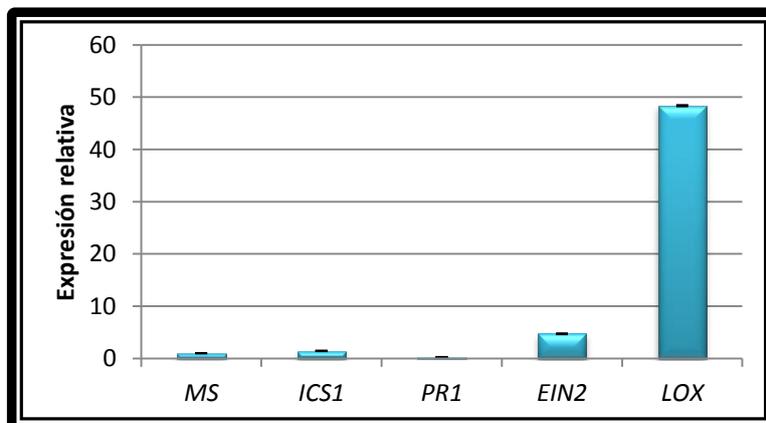


Figura 13. Real Time PCR cuantitativa de los genes *ICS1*, *PR1*, *EIN2* y *LOX1* en plántulas de tomate inoculadas con *T. parareesei* T6. El ARN total fue extraído de la parte aérea de las plántulas de tomate a los 6 días de la inoculación con agua (control) o 1×10^6 esporas de la cepa T6 en placas con plántulas de 3 días. El gen de actina se usó como control interno. Los valores corresponden a medidas relativas respect a sus correspondientes transcritos en las placas control ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$). Las barras de error representan las desviaciones estándar de dos réplicas biológicas.

Estos resultados se complementaron con el análisis de expresión de estos genes marcadores a diferentes tiempos empleando material vegetal obtenido del ensayo *in vivo* realizado en macetas. Se pudo observar un perfil de expresión ondulante a lo largo del tiempo para los distintos genes (Figura 14), siendo máxima la expresión a las 24 horas tras la inoculación de T6 para *LOX1*, *EIN2* e *ICS1*, y a las 48 horas para *PR1*.

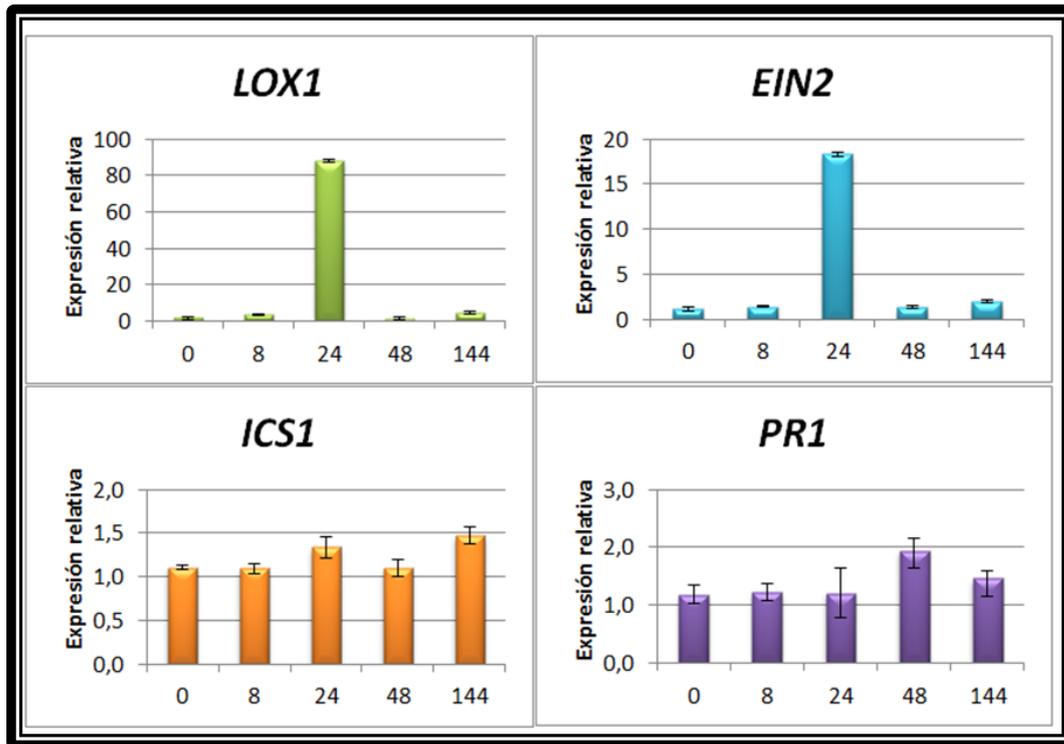


Figura 14. Análisis de la expresión relativa de genes de defensa mediante *Real Time* PCR en plantas de tomate de 4 semanas inoculadas con *T. parareesei* T6 a distintos tiempos (horas). Los genes analizados fueron: *LOX1*, ruta del JA, (AAA74393); *EIN2*, ruta del ET, (AAS67011); *ICS1*, biosíntesis de SA, (ABA39073) y *PR1*, ruta del SA, (ACB88202). El gen de la actina se usó como control interno. Los valores corresponden a medidas relativas respecto a sus correspondientes transcritos en controles sin inocular con *Trichoderma* ($2^{-\Delta\Delta Ct}=1$). Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas técnicas de una mezcla de cuatro réplicas biológicas.

DISCUSIÓN

En los últimos años, las interacciones moleculares *Trichoderma*-planta se han explorado en diferentes especies y sistemas vegetales (Shoresh y col., 2010; Hermosa y col., 2012). La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con cepas reconocidas como buenos agentes de biocontrol, aunque con algunas excepciones como es el caso de *Trichoderma pseudokoningii* (Luo y col., 2010), y las habilidades de los miembros del grupo o “clade” *Longibrachiatum* han permanecido prácticamente inexploradas. En este capítulo se ha intentado rellenar este hueco estudiando la interacción mutualista entre *T. parareesei* y plantas de tomate, analizando los cambios transcriptómicos que tienen lugar en el hongo, así como la estimulación de las defensas y el desarrollo de las plantas que tienen lugar en dicha interacción. El micoparasitismo es una propiedad ancestral del género *Trichoderma*, y los datos genómicos indican que *T. reesei* ha perdido parcialmente la capacidad de antagonizar, parasitar, o incluso matar a otros hongos (Druzhinina y col., 2011; Kubicek y col., 2011). Un estudio reciente ha confirmado el menor potencial micoparasítico de *T. reesei* en comparación con otras especies altamente micoparasíticas como *T. atroviride* o *T. virens* (Atanasova y col., 2013). Pero, a pesar de la proximidad genética entre *T. reesei* y *T. parareesei*, este último ha mantenido un potencial antagonista (Druzhinina y col., 2010).

Para facilitar las comparaciones con otras especies de *Trichoderma*, se llevó a cabo un análisis transcriptómico de la cepa T6 tras 20 horas de interacción con plantas de tomate, utilizando el mismo sistema de *microarrays* de *Trichoderma* y las mismas condiciones experimentales que en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral con las cepas *T. hamatum*, *T. harzianum* y *T. virens* colonizando raíces de tomate. Los *microarrays* utilizados contenían 374.824 sondas que representaban un total de 34.138 transcritos genómicos correspondientes a 14 cepas diferentes de *Trichoderma*, ninguna de ellas pertenecientes a la especie *T. parareesei*. Este hecho supone la mayor limitación de nuestra aproximación ya que los resultados podrían conllevar falsos negativos. No obstante, el genoma completo de *T. reesei*, la especie más cercana a *T. parareesei*, estuvo depositado en los *microarrays*. En este sentido, de los 250 juegos de sondas que mostraron diferencias significativas de expresión en interacción con la planta, el 57,6% de los genes sobrerregulados y el 80,6% de los genes infrarregulados fueron ortólogos de *T. reesei*. Otro factor limitante de nuestra aproximación, podría ser la estandarización de las condiciones de cultivo en las interacciones hongo-planta. *T. parareesei* se adicionó al medio MS líquido conteniendo semillas de tomate previamente germinadas durante 15 días. La presencia del material vegetal provocaría cambios en la composición del medio de cultivo así como la liberación de exudados procedentes de las plántulas, hecho que no ocurriría en la condición control, en la que el hongo se inoculó en el medio MS solo, en ausencia de planta. Por este motivo, la cantidad apropiada de nutrientes disponible para el crecimiento del hongo era difícil de estimar. Sin embargo, esta limitación no afecta a las comparaciones con los

microarrays de *Trichoderma* del capítulo anterior ya que fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones.

Pocos genes aumentaron su expresión en T6 en interacción con la planta, a diferencia de lo observado en las tres cepas de biocontrol analizadas en el capítulo anterior donde predominaron los juegos de sondas sobrerregulados. En relación a estos, el metabolismo de carbohidratos y los procesos de transporte estuvieron sobrerrepresentados en *T. hamatum*, *T. harzianum*, y *T. virens* durante su interacción con tomate, mientras que no aparecieron categorías GO significativamente sobrerrepresentadas en T6 bajo condiciones idénticas. A diferencia de la marcada sobrerregulación metabólica observada en *T. harzianum* en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, T6 mostró una disminución en la expresión de un gran número de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos, soporte nutricional y funciones celulares básicas, indicando que el flujo de carbohidratos entre T6 y la planta era significativamente bajo tras 20 horas de interacción entre ellos. El predominio de genes de transporte infrarregulados, sugiere que después de la adherencia de las hifas a las raíces vegetales y su colonización, la toma de nutrientes por parte de *T. parareesei* T6 podría estar limitada, el menos en estadíos tempranos. Este hecho ya se observó durante la interacción de *T. hamatum* con plantas de tomate en el capítulo anterior. Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con la sobrerregulación de genes de transporte observada en los transcriptomas de *T. harzianum* y *T. virens* en interacción con plantas (Chacón y col., 2007; Samolski y col., 2009), también observada en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral.

A pesar del bajo metabolismo de T6 tras 20 horas de interacción, esta cepa fue capaz de incrementar el desarrollo de raíces laterales de las plántulas de tomate de 2 a 4 días después de su aplicación, y este incremento fue similar al observado en las plántulas de tomate inoculadas con *T. hamatum* o *T. harzianum*. Esto podría indicar una interacción positiva entre T6 y la planta de tomate. Aunque el hongo permanecía de alguna manera inactivo metabólicamente tras 20 horas de interacción con la planta, dos transportadores ABC y dos transportadores MFS aparecieron sobrerregulados. Estudios anteriores basados en proteómica y *microarrays* también han puesto de manifiesto la sobrerregulación de un transportador ABC en la interacción de *T. atroviride* y *T. harzianum* con plantas (Marra y col., 2006; Chacón y col., 2007).

Interesantemente, uno de los pocos juegos de sondas sobrerregulados correspondió a un gen ortólogo a *Thpg1*, que codifica una endopoligalacturonasa de *T. harzianum* implicada en la colonización eficiente de las raíces y en la inducción de defensas de la planta (Morán-Diez y col., 2009). También se observó la sobrerregulación de un juego de sondas correspondiente a una fosfolipasa. Esta clase de enzimas es ubicua y está implicada en diversas respuestas celulares incluyendo el

proceso de disrupción de membranas durante la invasión de las células por parte de un hospedador (Istivan y Coloe, 2006). Recientemente, se ha descrito la sobreexpresión de una fosfolipasa A2 de *T. harzianum* durante la colonización de semillas de tomate en germinación (Mehrabi-Koushki y col., 2012).

Otro juego de sondas sobreexpresado mostró homología con la enzima quimérica espermidina sintetasa/sacaropina deshidrogenasa, implicada en la biosíntesis de espermidina y en el metabolismo de lisina y que juega un papel en la ruta del ácido α -aminoadípico. Se sabe que en *A. nidulans* se requieren altos niveles de espermidina para la transición del tubo germinativo a hifa para la diferenciación de los tejidos y la producción de metabolitos secundarios (Jin y col., 2002). La actividad sacaropina deshidrogenasa está implicada en el paso de lisina a ácido piperídico, que puede ser utilizado por péptido sintetasa no ribosomal como un sustrato para sintetizar metabolitos secundarios. Curiosamente, pudimos observar una sobreexpresión de un péptido sintetasa no ribosomal en la interacción de T6 con plantas de tomate, así como de una quinato deshidrogenasa, que juega un papel principal en la ruta del shikimato para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y SA. Aunque cabría esperar que proteínas de tipo hidrofobina o relacionadas con ellas (como las ceratoplataninas), implicadas en la interacción del hongo con su medio externo (Seidl-Seiboth y col., 2011), la colonización de raíces (Viterbo y Chet, 2006) y la inducción de la defensa sistémica en plantas (Djonović y col., 2006; Seidl y col., 2006), estuvieran sobreexpresadas en *T. parareesei*, se observó una menor expresión en presencia de plantas de tomate, hecho que también fue observado en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral para *T. virens*.

El bajo metabolismo de T6 durante su interacción con la planta podría deberse a que las plantas modifican la composición del medio. Podría ser difícil comparar la interacción de T6 con otras interacciones *Trichoderma*-planta ya que el rango de temperatura para el crecimiento óptimo de *T. parareesei* es más alto que para otras especies de biocontrol de *Trichoderma* (Atanasova y col., 2010).

Un trabajo anterior puso de manifiesto que tanto *T. parareesei* como *T. reesei* inhibían el crecimiento de plántulas de berro del jardín (*Lepidium sativum*) en ensayos en placa (Atanasova y col., 2010). Nuestros estudios *in vitro* presentaron resultados contrarios, mostrando el típico efecto auxina con un aumento en el desarrollo de las raíces laterales, tal y como ya se ha demostrado para otras especies de *Trichoderma* (Contreras-Cornejo y col., 2009), y mostrando también modificaciones sistémicas en la planta, que se observaron con cambios de expresión de genes relacionados con la defensa frente a patógenos. La discrepancia entre ambos estudios podría ser debida a las diferencias en las condiciones experimentales. La colonización de las raíces por parte de *Trichoderma* dispara una respuesta sistémica señalizada por JA/ET de una

manera similar a la descrita en rizobacterias (Shoresh y col., 2005). Las defensas sistémicas inducidas por *Trichoderma* también pueden ser señalizadas por SA (Gallou y col., 2009; Salas-Marina y col., 2011), aunque depende del fondo genético de la planta, el tiempo de interacción, la cepa usada y la concentración del inóculo (Hermosa y col., 2012; Tucci y col., 2011). El ensayo *in vivo*, realizado en este capítulo a distintos tiempos, mostró que las respuestas de defensa frente a patógenos inducidas por T6 en la planta son ondulantes y por tanto compatibles con el modelo propuesto en *Arabidopsis*, donde las fases temporales de señalización hormonal indican el establecimiento de inmunidad sistémica (Truman y col., 2010). Los picos de expresión observados a las 24 o 48 horas para los genes marcadores *EIN2*, *LOX1*, *ICS1* o *PR1*, están de acuerdo con el modelo de antagonismo entre la ruta de señalización del SA y la del JA/ET propuesta por Pieterse y col. (2009).

Los resultados de expresión de los distintos genes marcadores obtenidos de los ensayos *in vitro* e *in vivo* deben compararse con cautela ya que son dos sistemas muy diferentes realizados en distintas condiciones experimentales. No obstante, la expresión de todos los genes ensayados, a excepción de *PR1*, se vio significativamente sobrerregulada en ambos sistemas a las 144 horas (6 días).

Un estudio previo de la interacción *T. harzianum*-*Arabidopsis* mostró una infrarregulación de genes relacionados con SA, seguida de un posterior aumento de su expresión (Morán-Diez y col., 2012). Esto está de acuerdo con el perfil del gen *PR1* observado en las plantas de tomate durante las primeras 48 horas tras la inoculación de la cepa T6. La relativamente baja expresión de *PR1* a las 8 y 24 horas, junto con el aumento de expresión de *ICS1* a las 24 horas y de *PR1* a las 48 horas apoyaría la hipótesis de que estos perfiles son así para limitar la penetración del hongo en las primeras células corticales de la raíz, como ya se ha descrito para otras especies de *Trichoderma* previamente (Yedidia y col., 1999; Chacón y col., 2007; Alonso-Ramírez y col., 2014).

Los efectos positivos observados de la cepa T6 sobre tomate podrían sugerir el uso de *T. parareesei* en la protección de plantas como agente de biocontrol y/o como un microorganismo beneficioso para las mismas. Sin embargo, *T. parareesei* tiene una temperatura óptima de crecimiento de entre 35-40°C, que está muy próxima a la de patógenos humanos, como por ejemplo *T. longibrachiatum*. Por este motivo, se deberían realizar estudios de evaluación de riesgos antes de considerar cualquier aplicación *in vivo* de esta especie en agricultura comercial.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

1. ANTECEDENTES

Nuestro grupo llevó a cabo el aislamiento y la caracterización del gen *Thctf1* de *T. harzianum* T34, que muestra una alta homología de secuencia con un factor de transcripción descrito en *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, y se analizó su función siguiendo una estrategia de disrupción génica, por medio de la cual se obtuvieron mutantes $\Delta Thctf1$ (Rubio y col., 2009). Con este fin, se construyó un *cassette* de disrupción que contenía el gen *amdS*, que codifica una acetamidasa, de *A. nidulans* flanqueado por 2.606 pb de la región 5' del gen *Thctf1* (incluyendo 903 pb del promotor) y 2.131 pb de la región 3' del mismo (incluyendo 421 pb del terminador), y el *cassette* resultante se utilizó para transformar protoplastos de *T. harzianum* T34. Se utilizó el gen *amdS* de *A. nidulans* ya que es bien sabido que genes que codifican acetamidasas funcionan como buenos marcadores de selección en la transformación de hongos como *Aspergillus niger* o *Penicillium chrysogenum* (Kelly y Hynes, 1985; Kolar y col., 1988).

Se realizaron experimentos en los que se recubrieron semillas de tomate con esporas de *T. harzianum* T34. Las plantas de tomate obtenidas a partir de estas semillas mostraron un incremento en la longitud de las raíces con respecto a las plantas control, obtenidas de semillas sin tratar (Figura 15). Sin embargo, esta elongación radicular fue mucho más notable cuando las semillas de tomate se recubrieron con esporas de los disruptantes $\Delta Thctf1$ (Figura 15), por lo que, inicialmente, se pensó que ese efecto diferencial observado entre la cepa silvestre y los disruptantes en su interacción con la planta podría deberse a la interrupción del gen *Thctf1*.

Cuando se incluyeron en los ensayos semillas de tomate recubiertas con esporas de transformantes que llevaban insertadas al azar copias del *cassette* de disrupción, pero mantenían intacto el gen *Thctf1*, se observó una elongación de las raíces similar a la producida por los disruptantes $\Delta Thctf1$ (Figura 15). Este resultado nos hizo pensar que el efecto observado no se debía a la interrupción del gen *Thctf1*, sino a la presencia del gen *amdS* de *A. nidulans*, incluido en el *cassette* de disrupción, y por tanto insertado en el genoma de *T. harzianum* T34. Teniendo en cuenta esto, nos pareció interesante abordar la transformación de T34 con el gen *amdS* de *A. nidulans* y analizar en profundidad los efectos que provoca la inserción de este gen en dicha cepa en su interacción con plantas de tomate.



Figura 15. Fenotipo de plantas de tomate originadas a partir de semillas que habían sido recubiertas, de izquierda a derecha, con agua (control), con la cepa silvestre *T. harzianum* T34, con Δ D1-38, disruptante que presenta interrumpido el gen *Thctf1*, o con Δ J3-16, transformante que mantiene intacto el gen *Thctf1* pero que lleva insertadas al azar copias del *cassette* de disrupción para ese mismo gen en su genoma.

2. OBTENCIÓN DE CEPAS DE *T. harzianum* T34 QUE EXPRESAN EL GEN *amdS* DE *A. nidulans*

Para obtener cepas de *T. harzianum* T34 que expresan el gen *amdS* de *A. nidulans*, se llevó a cabo una transformación heteróloga con el plásmido pLMG::*amdS*. El proceso de construcción de este plásmido se representa en la Figura 16 y se detalla a continuación. En primer lugar, se amplificó el gen *amdS* de *A. nidulans* a partir del vector p3SR2 (Kelly y Hynes, 1985), utilizando los oligonucleótidos: *amdS*-NT y *amdS*-CT. Por otro lado, se digirió el plásmido pLMG con *Xba*I y se generaron extremos romos utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa. A continuación, se llevó a cabo la ligación del plásmido con el producto de PCR, dando como resultado el vector pLMG::*amdS* que, finalmente, se linearizó mediante digestión con *Eco*RI para facilitar su integración en el genoma del hongo.

El plásmido linearizado se utilizó para transformar protoplastos de *T. harzianum* T34 siguiendo el método descrito por Cardoza y col. (2006), que es una optimización del protocolo de obtención de protoplastos descrito por Penttilä y col. (1987), y que está detallado en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos.

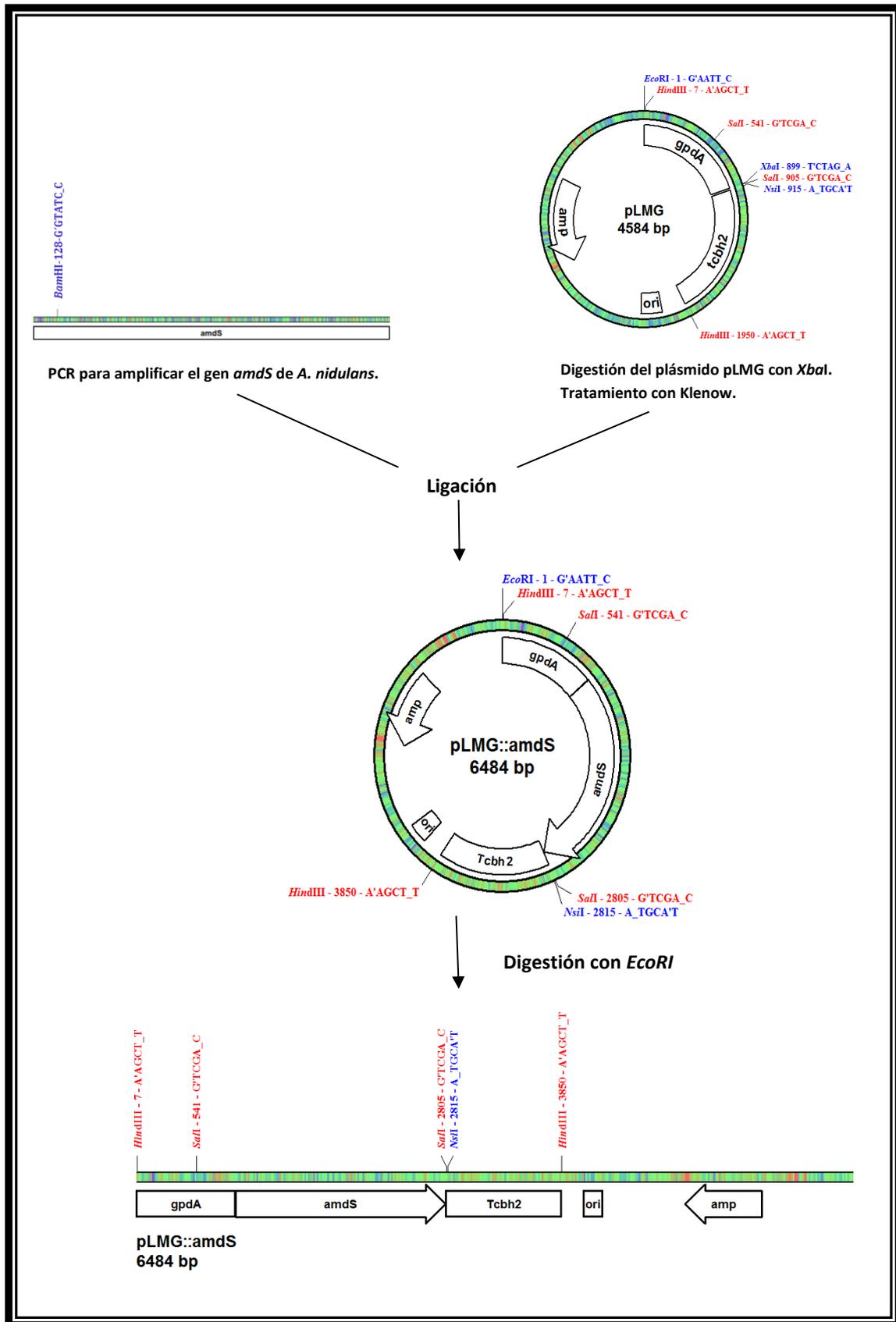


Figura 16. Esquema de la construcción del plásmido pLMG::amdS. La enzima *EcoRI* se usó para linearizar el plásmido. Para más detalles, consultar el texto.

Se obtuvieron 176 cepas capaces de crecer en el medio selectivo utilizado (MSS), que contenía acetamida como fuente de nitrógeno. Las cepas transformadas se estabilizaron mediante un proceso que consistió en tres pases sucesivos por medio selectivo (MST), a los que siguió un cuarto pase por medio no selectivo (PPG) y, finalmente, un último pase por medio selectivo (MST) en el que se sembraron en estría (Figura 17). A partir de las 45 cepas (un 79,2 % de los 176 transformantes iniciales) que presentaron un crecimiento homogéneo, se generaron cultivos monospóricos en medio PPG.

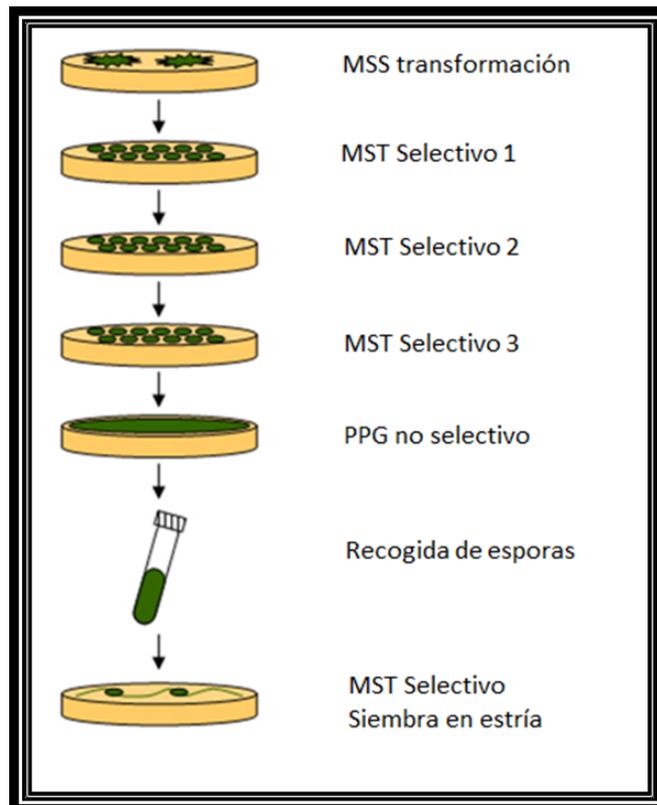


Figura 17. Esquema del proceso de selección de cepas transformadas estables para el carácter *amdS+*. MSS, medio selectivo con sorbitol, MST, medio selectivo con Tritón X-100, PPG, medio no selectivo.

3. CONFIRMACIÓN DE LOS TRANSFORMANTES OBTENIDOS

3.1. MEDIANTE PCR

Se analizó si el plásmido pLMG::*amdS* linearizado estaba presente en el genoma de los 45 transformantes estables obtenidos. Inicialmente, se realizó un escrutinio de las cepas mediante PCR empleando el método descrito por van Zeijl y col. (1998) que permite un análisis rápido de un gran número de muestras a partir de micelio (apartado 6.1.2.2 de Materiales y Métodos). Se emplearon los oligonucleótidos *gpd3F* y *amdS-3* que amplifican un fragmento de 1.743 pb del plásmido, incluyendo parte del promotor del gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A (*gpdA*) y

parte del gen *amdS*, ambos de *A. nidulans*. La cepa silvestre *T. harzianum* T34 se empleó como control negativo en las reacciones de PCR. En 15 de las cepas ensayadas se pudo observar el producto de 1.743 pb. Los resultados obtenidos para algunos de los transformantes aparecen recogidos en la Figura 18.

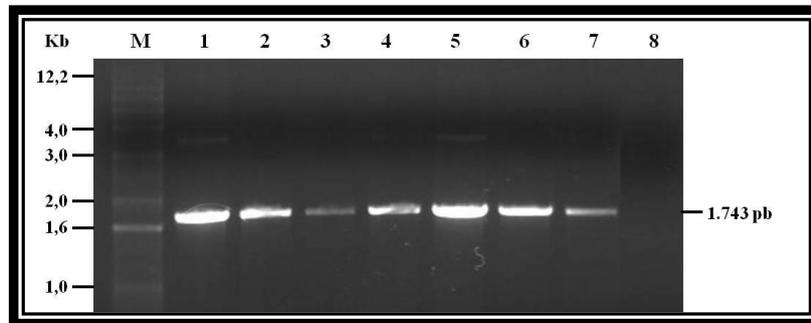


Figura 18. Productos de PCR obtenidos a partir de micelio, crecido y procesado como se explica en el apartado 6.1.2.2 de Materiales y Métodos, de las cepas *amdS4*, *amdS6*, *amdS55*, *amdS111*, *amdS116*, *amdS122* y *amdS148* (carriles 1 a 7) y de la cepa silvestre *T. harzianum* T34 (carril 8). Se utilizaron los oligonucleótidos *gpd3F* y *amdS-3*. M: Marcador 1 kb DNA *ladder* X (Roche).

Para confirmar que estas 15 cepas presentaban en su genoma el plásmido *pLMG::amdS* linearizado, se realizó una nueva amplificación por PCR empleando como molde ADN genómico de dichas cepas y los oligonucleótidos *Tcbh2-R* y *amdS-RT4*, que amplifican un fragmento de 1.328 pb del plásmido. La cepa silvestre *T. harzianum* T34 se empleó, de nuevo, como control negativo en las reacciones de PCR. Los 15 transformantes presentaron la banda esperada de 1.328 pb mientras que la cepa silvestre careció de ella. En la Figura 19 se muestra el resultado de la amplificación para la cepa silvestre y seis de los transformantes.

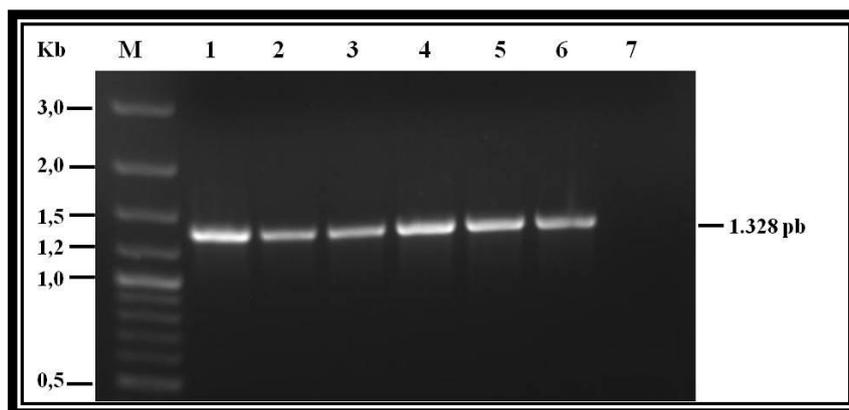


Figura 19. Productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de las cepas *amdS4*, *amdS6*, *amdS55*, *amdS111*, *amdS116* y *amdS122* (carriles 1 a 6) y de la cepa silvestre T34 (carril 7). Se utilizaron los oligonucleótidos *Tcbh2-R* y *amdSRT4*. M: Marcador 100 pb Plus DNA *ladder* (Invitrogen).

3.2. ANÁLISIS *Southern blot* DE LOS TRANSFORMANTES

Para analizar el número de copias del plásmido pLMG::*amdS* que se había integrado en el genoma de las cepas transformadas se realizó un análisis tipo *Southern blot*. Se digirieron 10 µg de ADN genómico de cada cepa con *EcoRV*, que corta dos veces en el plásmido linearizado, liberando un fragmento de 590 pb. La sonda utilizada se preparó marcando con digoxigenina un producto de PCR de 2.203 pb, que incluía parte del promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans*, el gen *amdS* de *A. nidulans* y parte del terminador del gen que codifica la celobiohidrolasa 2 (*tcbh2*) de *T. reesei*, obtenido empleando los oligonucleótidos *gpd3F* y *cbh2*, y ADN del vector pLMG::*amdS* como molde.

La sonda no hibridó con el ADN de la cepa silvestre, pero sí con el de los transformantes, demostrando que el plásmido pLMG::*amdS* se había introducido en el genoma de todos ellos. Las cepas *amdS115*, *amdS107*, *amdS67* y *amdS6* presentaron tres bandas de hibridación, una de ellas de 590 pb, indicando la inserción de una sola copia del plásmido en su genoma. El resto de las cepas transformadas presentaron un mayor número de bandas, resultado que sugiere la presencia de dos o más copias del plásmido (Figura 20).

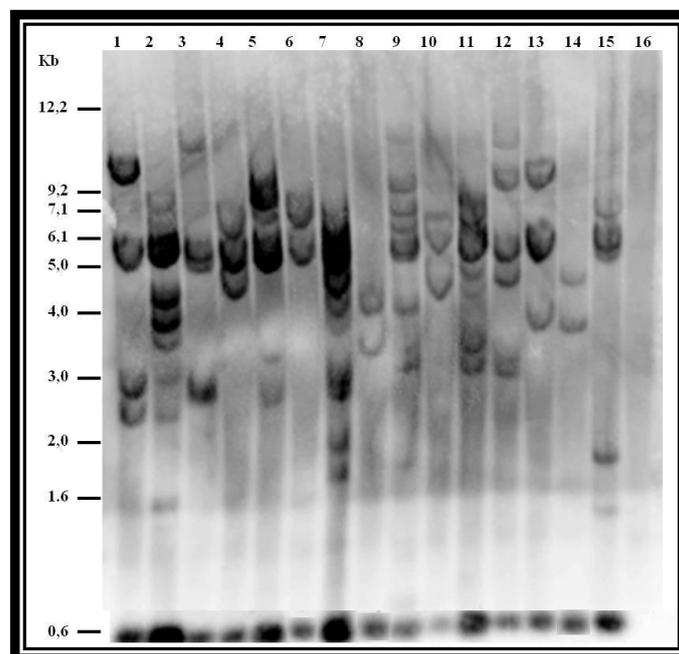


Figura 20. Análisis tipo *Southern blot* del ADN genómico de las cepas transformadas *amdS151* (1), *amdS148* (2), *amdS125* (3), *amdS122* (4), *amdS116* (5), *amdS115* (6), *amdS111* (7), *amdS107* (8), *amdS94* (9), *amdS67* (10), *amdS63* (11), *amdS55* (12), *amdS21* (13), *amdS6* (14), *amdS4* (15) y de la cepa silvestre *T. harzianum* T34 (16). El ADN genómico se digirió con *EcoRV*, la hibridación se realizó en condiciones restrictivas, y como sonda se utilizó un fragmento de 2.203 pb que incluía parte del promotor del gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A (*gpdA*) de *A. nidulans*, el gen *amdS* de *A. nidulans* y parte del terminador del gen que codifica la celobiohidrolasa 2 (*tcbh2*) de *T. reesei*. Marcador 1 kb DNA ladder X (Roche).

Para simplificar el número de transformantes con los que llevar a cabo estudios posteriores, se eligieron dos de ellos: amdS6 y amdS122, con una y dos copias del plásmido pLMG::amdS linearizado insertadas en su genoma, respectivamente.

3.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *amdS* EN LOS TRANSFORMANTES

Para comprobar si la introducción del plásmido pLMG::amdS en el genoma de *T. harzianum* T34 daba lugar a la expresión del gen *amdS*, se realizó una *Real Time* PCR, tal y como se indica en el apartado 7.3.4 de Materiales y Métodos.

El ARN total se extrajo de micelios obtenidos tras cultivar la cepa silvestre T34 y los dos transformantes en MM (Penttilä y col., 1987) con acetamida 10 mM durante 4 horas, tal y como se describe en el apartado 4.1.1.3 de Materiales y Métodos. El ADNc se sintetizó a partir de este ARN total (apartado 7.2.2.2.2 de Materiales y Métodos), y se utilizó como molde en las reacciones de *Real Time* PCR. Para analizar la expresión del gen *amdS* se emplearon los oligonucleótidos amdS-RT1 y amdS-RT2, diseñados sobre la ORF de dicho gen. Como control interno se utilizó el marcador SCAR Q2413 específico de *T. harzianum* T34 (Rubio y col., 2005), usando los oligonucleótidos Q2413-fw y Q2413-rev. La especificidad de los productos de PCR se confirmó mediante electroforesis en un gel de agarosa, obteniéndose un fragmento de 153 pb para el gen *amdS*, y de 110 pb para el control interno.

Se observó expresión del gen *amdS* en las cepas amdS6 y amdS122, y no en la cepa silvestre T34, siendo mayor el nivel de transcrito detectado en el transformante amdS122, que contenía dos copias del plásmido pLMG::amdS linearizado en su genoma (Figura 21).

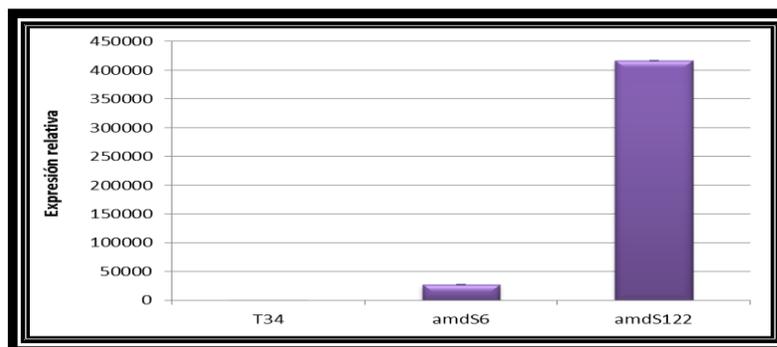


Figura 21. Análisis de expresión del gen *amdS* de *A. nidulans* en *T. harzianum* T34 (condición basal) y los transformantes amdS6 y amdS122 mediante *Real Time* PCR. El experimento se realizó con 1 μ L de ADNc obtenido a partir de ARN total extraído de micelio de las cepas crecidas en MM (Penttilä y col., 1987) suplementado con acetamida 10 mM durante 4 horas, tal y como se describe en el apartado 4.1.1.3 de Materiales y Métodos. Como control interno se utilizó el marcador SCAR Q2413 (Rubio y col., 2005) de *T. harzianum* T34. Se tomó como valor de la condición basal $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$.

4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS TRANSFORMANTES

Con objeto de analizar si la expresión heteróloga del gen *amdS* de *A. nidulans* afectaba a la capacidad de crecimiento, esporulación y/o pigmentación de *T. harzianum* en medio PDA o PDA conteniendo distintos tipos de amidas, se realizó un ensayo en placa, tal y como se describe en el apartado 9 de Materiales y Métodos.

El crecimiento de los transformantes *amdS6* y *amdS122* fue mayor que el de *T. harzianum* T34 tanto en medio PDA como en PDA suplementado con acetamida, formamida o urea (Tabla 14). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de crecimiento entre las tres cepas en medio PDA suplementado con acrilamida (Tabla 14).

Tabla 14. Área de crecimiento (cm²) de la cepa silvestre T34 y de los transformantes *amdS6* y *amdS122* en medio de cultivo PDA, PDA suplementado con 10 mM de acetamida, acrilamida, formamida o urea, tras 72 horas de incubación a 28°C. Los valores con las mismas letras dentro de una misma columna no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

	PDA	PDA + Acetamida	PDA + Acrilamida	PDA + Formamida	PDA + Urea
T34	33,05 ± 2,57 ^a	35,62 ± 1,69 ^a	26,12 ± 0,69 ^a	37,44 ± 3,42 ^a	42,45 ± 2,07 ^a
amdS6	45,37 ± 1,19 ^b	43,80 ± 1,79 ^b	24,95 ± 1,77 ^a	41,29 ± 1,14 ^b	45,57 ± 0,69 ^b
amdS122	45,96 ± 0,60 ^b	43,01 ± 0,58 ^b	27,19 ± 1,16 ^a	42,62 ± 0,67 ^b	46,57 ± 1,59 ^b

Por otro lado, el número de esporas en los dos transformantes fue menor que en la cepa silvestre en todos los medios de cultivo ensayados excepto en PDA sin suplementar con amidas, medio en el que no se observaron diferencias significativas de esporulación entre el transformante *amdS6* y T34 (Tabla 15).

Tabla 15. Grado de esporulación (10⁸ esporas/ml) de la cepa silvestre T34 y de los transformantes *amdS6* y *amdS122* en medio de cultivo PDA, PDA suplementado con 10 mM de acetamida, acrilamida, formamida o urea, tras 9 días de incubación a 28°C. Los valores con las mismas letras dentro de una misma columna no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

	PDA	PDA + Acetamida	PDA + Acrilamida	PDA + Formamida	PDA + Urea
T34	5,66 ± 0,58 ^a	5,71 ± 0,29 ^a	2,75 ± 0,06 ^a	3,60 ± 0,04 ^a	1,92 ± 0,09 ^a
amdS6	5,35 ± 0,44 ^a	2,21 ± 0,13 ^b	0,87 ± 0,06 ^b	1,75 ± 0,22 ^b	1,12 ± 0,12 ^b
amdS122	4,04 ± 0,31 ^b	2,67 ± 0,13 ^c	0,79 ± 0,16 ^b	2,08 ± 0,07 ^c	0,75 ± 0,29 ^b

También se pudieron observar diferencias de pigmentación en placas de PDA con acetamida 10 mM que contenían cultivos de las cepas T34, amdS6 o amdS122, siendo esta pigmentación mayor en las placas de los transformantes (Figura 22).

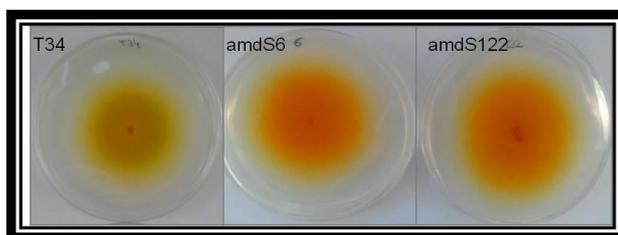


Figura 22. Pigmentación de las colonias de *T. harzianum* T34, amdS6 o amdS122 desarrolladas en medio PDA suplementado con acetamida 10 mM tras 72 horas de incubación a 28°C.

El estudio fenotípico de los transformantes se completó mediante un ensayo de crecimiento en PDB o PDB suplementado con distintos tipos de amidas, tal y como se describe en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Tras 48 horas, los micelios obtenidos se liofilizaron y se pesaron. Al igual que sucedió en PDA, el crecimiento de los transformantes fue mayor que el de la cepa silvestre en todos los medios ensayados, a excepción del medio PDB suplementado con acrilamida que el que no se observaron diferencias significativas (Tabla 16).

Tabla 16. Peso del micelio liofilizado (mg) de la cepa silvestre T34 y de los transformantes amdS6 y amdS122 en medio de cultivo PDB, PDB suplementado con acetamida 10 mM, con acrilamida 10 mM, con formamida 10 mM o con urea 10 mM, tras 48 horas de incubación a 28°C. Los valores con las mismas letras dentro de una misma columna no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

	PDB	PDB + Acetamida	PDB + Acrilamida	PDB + Formamida	PDB + Urea
T34	156,67 ± 5,77 ^a	163,33 ± 5,77 ^a	146,67 ± 5,77 ^a	180,00 ± 10,00 ^a	116,67 ± 15,27 ^a
amdS6	173,33 ± 5,77 ^b	190,00 ± 10,00 ^b	153,33 ± 5,77 ^a	206,67 ± 5,77 ^b	186,66 ± 5,77 ^b
amdS122	180,00 ± 10,00 ^b	193,33 ± 15,27 ^b	156,66 ± 5,77 ^a	203,33 ± 15,27 ^b	190,00 ± 10,00 ^b

Por otro lado, se midió el pH de los sobrenadantes obtenidos de dichos cultivos, y se pudo observar un aumento del mismo en el caso de los transformantes respecto a la cepa silvestre, siendo más pronunciado en presencia de acetamida, formamida y urea (Tabla 17).

Resultados Capítulo 3

Tabla 17. Valores de pH de los sobrenadantes de la cepa silvestre T34 y de los transformantes amdS6 y amdS122 en medio de cultivo PDB, PDB suplementado con 10 mM de acetamida, acrilamida, formamida o urea, tras 48 horas de incubación a 28°C. Los valores con las mismas letras dentro de una misma columna no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

	PDB	PDB + Acetamida	PDB + Acrilamida	PDB + Formamida	PDB + Urea
Blanco	4,9 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,1 ^a	4,7 ± 0,1 ^a
T34	5,2 ± 0,2 ^b	5,5 ± 0,1 ^b	4,0 ± 0,2 ^b	4,8 ± 0,1 ^a	5,6 ± 0,2 ^b
amdS6	5,6 ± 0,1 ^c	6,3 ± 0,1 ^c	4,2 ± 0,2 ^b	6,6 ± 0,1 ^b	6,8 ± 0,1 ^c
amdS122	5,7 ± 0,1 ^c	6,7 ± 0,1 ^d	4,2 ± 0,1 ^b	6,7 ± 0,1 ^b	7,0 ± 0,2 ^c

5. LIBERACIÓN DE AMONIO AL MEDIO DE CULTIVO

La acetamidasa es una enzima capaz de hidrolizar la acetamida liberando amonio y acetato. La funcionalidad de esta enzima se puede evaluar a través de la liberación de amonio al medio de cultivo. Con este fin, la cepa silvestre T34 y los transformantes amdS6 y amdS122 se cultivaron en PDB solo o en presencia de distintas amidas a una concentración de 10 mM (apartado 4.1.1.2 de Materiales y Métodos). Tras 48 horas de incubación se recogieron los sobrenadantes por filtración mediante vacío y, posteriormente, se midió la cantidad de amonio presente en los mismos (apartado 10 de Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 18. Se pudo observar que los dos transformantes eran capaces de liberar más amonio al medio de cultivo que la cepa silvestre en todas las condiciones ensayadas, incluso en el medio basal, en ausencia de cualquier amida que pudiese actuar como única fuente de carbono y de nitrógeno. Estas diferencias entre T34 y los transformantes fueron estadísticamente significativas después de analizar los datos mediante el test de Duncan.

Tabla 18. Concentración de amonio (mM) presente en los sobrenadantes de la cepa silvestre T34 y de los transformantes amdS6 y amdS122 tras su crecimiento, durante 48 horas en PDB o PDB suplementado con acetamida 10 mM, con acrilamida 10 mM, con formamida 10 mM o con urea 10 mM. Cada valor es la media de tres medidas ± desviación estándar. Los valores con las mismas letras dentro de una misma columna no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

	PDB	PDB + Acetamida	PDB + Acrilamida	PDB + Formamida	PDB + Urea
T34	63,43 ± 2,14 ^a	55,33 ± 4,06 ^a	15,33 ± 1,09 ^a	62,95 ± 2,89 ^a	22,95 ± 2,06 ^a
amdS6	106,52 ± 1,80 ^c	135,57 ± 3,78 ^b	22,24 ± 1,49 ^b	159,62 ± 5,02 ^b	155,81 ± 5,46 ^b
amdS122	110,10 ± 0,82 ^b	157,71 ± 4,68 ^c	22,48 ± 1,80 ^b	160,10 ± 4,12 ^b	136,05 ± 5,73 ^c

6. EFECTO DE LOS TRANSFORMANTES amdS de *Trichoderma* SOBRE PLANTAS DE TOMATE

6.1. ENSAYOS *in vitro*

Para evaluar el efecto de *T. harzianum* T34 y los transformantes amdS6 y amdS122 sobre el crecimiento y el desarrollo de plantas de tomate, inicialmente se realizó un ensayo de interacción *in vitro*, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.2 de Materiales y Métodos.

Este ensayo *in vitro* mostró que las tres cepas de *Trichoderma* ejercían un efecto beneficioso en el desarrollo del tallo de las plántulas de tomate, siendo mucho mayor el efecto causado por los transformantes que por la cepa silvestre (Tabla 19). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas después de analizar los datos mediante el test de Duncan.

Tabla 19. Longitud (cm) de la parte aérea de plántulas de tomate sin tratar (control), tratadas con la cepa silvestre *T. harzianum* T34 y tratadas con los transformantes amdS6 y amdS122. Cada valor es la media de 15 medidas \pm su desviación estándar. Los valores con distintas letras mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

Condición	Longitud del tallo (cm)
Control	3,91 \pm 0,15 ^a
T34	4,36 \pm 0,14 ^b
amdS6	4,86 \pm 0,15 ^c
amdS122	5,12 \pm 0,11 ^c

6.2. ENSAYOS *in vivo*

Posteriormente, se realizó un ensayo de interacción *in vivo*, tal y como se describe en el apartado 4.1.2.3 Materiales y Métodos, y se midió la longitud del tallo y de la raíz de las plantas de tomate 3 semanas después de la siembra de las semillas.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 20. Se pudo observar que *T. harzianum* T34 aumentaba la longitud del tallo y raíces de las plantas de tomate. Además, las plantas procedentes de semillas recubiertas con los transformantes amdS6 y amdS122 presentaron mayor longitud, tanto de tallo como de raíz principal, que las procedentes de semillas recubiertas con la cepa silvestre.

Tabla 20. Efecto de las cepas T34, amdS6 y amdS122 de *T. harzianum* en el crecimiento de plantas de tomate. Las longitudes de raíces y tallos corresponden a plantas de 3 semanas sin tratar (control), o tratadas con las cepas T34, amdS6 o amdS122. Cada valor es la media de 24 medidas \pm su desviación estándar. Los valores con las mismas letras dentro de una misma columna no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

Condición	Longitud de raíz (cm)	Longitud del tallo (cm)
Control	19,1 \pm 2,2 ^a	9,3 \pm 0,9 ^a
T34	20,7 \pm 2,2 ^b	10,2 \pm 0,9 ^b
amdS6	22,3 \pm 3,1 ^c	11,5 \pm 0,8 ^c
amdS122	23,5 \pm 2,8 ^c	12,3 \pm 0,7 ^d

6.3. MEDIDA DEL NITRÓGENO Y CARBONO EN PLANTAS DE TOMATE

Para evaluar el efecto de los transformantes de *Trichoderma* que expresan el gen *amdS* de *A. nidulans* en el estatus nutricional de plantas de tomate, se determinó la cantidad de nitrógeno y carbono presente en la parte aérea de las mismas según el apartado 12 de Materiales y Métodos.

Tabla 21. Contenido total de nitrógeno y carbono en plantas de tomate tratadas con agua, y con las cepas T34, amdS6 y amdS122. Cada valor es la media de 5 medidas (cada una con 5 plantas) \pm su desviación estándar. Los valores con las mismas letras dentro de una misma columna no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

Condición	Nitrógeno (mg/planta)	Carbono (mg/planta)
Control	9,59 \pm 0,47 ^a	69,44 \pm 7,32 ^a
T34	12,54 \pm 0,78 ^b	84,76 \pm 5,27 ^b
amdS6	14,69 \pm 1,40 ^c	98,65 \pm 7,05 ^c
amdS122	16,18 \pm 2,47 ^c	107,19 \pm 9,29 ^c

Los resultados demostraron que las plantas de tomate pildoradas con *T. harzianum* T34 tenían un contenido mayor tanto en nitrógeno como en carbono, y que este contenido era aún mayor en las plantas de tomate tratadas con los dos transformantes amdS.

7. ENSAYOS ANTIFÚNGICOS *in vitro* EN CULTIVOS DUALES

Con objeto de conocer si la expresión del gen *amdS* de *A. nidulans* en *T. harzianum* T34 afectaba a la capacidad antifúngica de esta cepa de biocontrol, se enfrentaron la cepa silvestre y los dos transformantes a los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *R. solani*, *B. cinerea* y al oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*, mediante cultivo dual (apartado 11 de Materiales y Métodos).

De forma general, se pudo observar cómo frente a *R. solani*, *B. cinerea* y *P. ultimum* el mecanismo de biocontrol predominante en *T. harzianum* fue el micoparasitismo, ya que el antagonista sobrecreció la colonia del patógeno; mientras que frente a *F. oxysporum* el antagonista actuó principalmente por competición, rodeando por completo, sin saltar, al patógeno. No se observaron diferencias de comportamiento entre las tres cepas de *Trichoderma* estudiadas frente a estos cuatro patógenos en las condiciones ensayadas.

8. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE PLANTAS DE TOMATE EN SU INTERACCIÓN CON *T. harzianum* T34 Y LOS TRANSFORMANTES *amdS*

Con objeto de determinar el papel que desempeña el gen *amdS* en la interacción de *T. harzianum* con plantas de tomate, se analizó el transcriptoma de *S. lycopersicum* en su interacción con la cepa silvestre T34 de *T. harzianum* y con los transformantes *amdS6* y *amdS122*. Para ello se utilizaron los *microarrays* comerciales de oligonucleótidos *GeneChip Tomato Genome Array* (Affymetrix). El proceso de tratamiento e hibridación de las muestras se llevó a cabo en la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca (UPG-USAL).

En estos ensayos se utilizaron plantas de tomate de 3 semanas, que provenían de semillas recubiertas con esporas de T34, con esporas de los transformantes *amdS6* o *amdS122*, o con agua en el caso de los controles, germinadas y crecidas en tierra comercial autoclavada y en condiciones controladas de invernadero, según se detalla en el apartado 4.1.2.3. de Materiales y Métodos. Transcurrido este tiempo, se recogió la parte aérea de las plantas, se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se extrajo el ARN, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.2.2 de Materiales y Métodos. Se utilizaron tres réplicas biológicas por condición y cinco plantas por cada réplica.

Una vez obtenido el ARN total de cada réplica, éste se envió a la UPG-USAL donde se realizó el análisis del ARN y la obtención del ADNc, el marcaje de las sondas y su posterior hibridación con los *GeneChip Tomato Genome Array* (Affymetrix), como se describe en los apartados 8.3.2, 8.4.2.2 y 8.5.2 de Materiales y Métodos, respectivamente. El tratamiento estadístico de los datos se realizó en la forma descrita en el apartado 13.3.1 de Materiales y Métodos.

8.1. ANÁLISIS GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los perfiles de expresión obtenidos tras el análisis de los *microarrays* de plantas de tomate en respuesta a la presencia de las distintas cepas de *T. harzianum*, en

comparación con aquellos obtenidos con la planta sola, fueron similares en las tres réplicas biológicas realizadas.

De un total de 10.038 juegos de sondas contenidos en los *microarrays* de tomate, 185 (1,84%) presentaron cambios significativos de expresión, de al menos dos veces ($FC \geq 2$ y $FDR: 0,10$) en respuesta a la presencia de cepas de *T. harzianum* con respecto a los controles sin *Trichoderma*.

En la Figura 23 se muestra la distribución de esos 185 juegos de sondas, expresados diferencialmente mediante un diagrama de Venn.

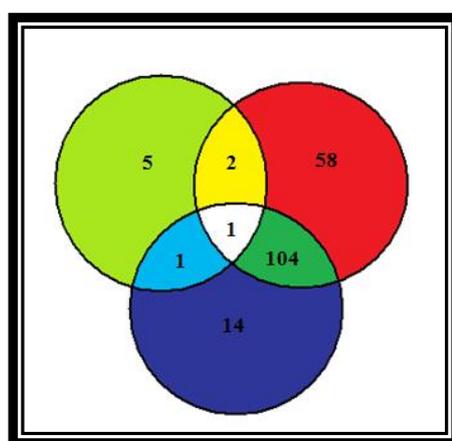


Figura 23. Diagrama de Venn que representa el número de juegos de sondas de los *microarrays* de tomate que presentaron cambios significativos de expresión en respuesta a la presencia de T34 (verde claro), amdS6 (rojo) y/o amdS122 (azul oscuro) en comparación con la planta sin *Trichoderma*.

Únicamente un juego de sondas se expresó diferencialmente en común en plantas de tomate en interacción con T34, amdS6 y amdS122 respecto a las plantas control (Tabla 22). Este juego de sondas correspondió a un gen que codifica una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), enzima relacionada con el metabolismo de carbohidratos, y presentó un aumento de expresión en plantas en interacción con los transformantes amdS y un descenso en la interacción con la cepa silvestre T34. Además, se pudieron observar mayores niveles de transcrito de un gen que codifica una neril-difosfato sintetasa 1, relacionada con el metabolismo secundario, y de un gen que codifica una proteína inhibidora de la catepsina D, relacionada con mecanismos de defensa, tanto en plantas de tomate en interacción con T34 como con amdS6, mientras que dichos niveles no se modificaron significativamente en plantas en interacción con amdS122 (Tabla 22). También se observó una menor expresión de un gen que codifica una proteína anotada en el genoma humano como “hemoglobina de clase 1 no simbiótica” (*nsHb1*), enzima relacionada con la asimilación de nitrógeno, en plantas en interacción con T34, mientras que dicha expresión aumentó en la

interacción con amdS122 (Tabla 22). Este gen también presentó un mayor nivel de transcrito en plantas en interacción con amdS6 pero con un $FC < 2$ por lo que no aparece reflejado en el diagrama de Venn.

Una descripción más detallada de todos estos genes aparece recogida en el apartado siguiente.

8.2. GENES DE PLANTAS DE TOMATE EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A *T. harzianum* T34

Un total de nueve juegos de sondas mostraron cambios estadísticamente significativos ($FC \geq 2$ y $FDR: 0,10$) en su expresión en la interacción de plantas de tomate con *T. harzianum* T34 (Figura 23): seis de ellos aumentaron su expresión (sobreexpresados), tres de los cuales mostraron homología con proteínas hipotéticas de función desconocida; y otros tres la disminuyeron (infraregulados) (Tabla 22).

Tabla 22. Resumen de los juegos de sondas que mostraron diferencias significativas ($FC \geq 2$ y $FDR: 0,1$) de expresión en plantas de tomate en interacción con T34 en comparación con plantas control sin *Trichoderma*. Estos juegos de sondas se agruparon en seis procesos fisiológicos diferentes, y su descripción se basó en la homología con secuencias presentes en la base de datos UNIPROT, empleando el algoritmo BLAST y considerando un valor $E < 10^{-5}$.

Proceso fisiológico	Descripción juegos de sondas	Juegos de sondas sobreexpresados	Juegos de sondas infraregulados
Metabolismo de carbohidratos	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)		1*
Metabolismo de aminoácidos	Treonina desaminasa	1	
Metabolismo secundario	Neril-difosfato sintetasa 1	1**	
Asimilación de nitrógeno	Hemoglobina de clase 1 no simbiótica (<i>nsHb1</i>)		1***
Defensa	Inhibidor de Catepsina D	1**	
	Defensina (<i>PDF1.2</i>)		1
Función desconocida		3	

* Juego de sondas cuya expresión también se modificó en plantas de tomate en interacción con amdS6 y con amdS122, siendo en estos casos sobreexpresado.

** Juegos de sondas cuya expresión también se modificó en plantas de tomate en interacción con amdS6, siendo en este caso también sobreexpresado.

*** Juego de sondas cuya expresión también se modificó en plantas de tomate en interacción con amdS122, siendo en este caso sobreexpresado.

Estos juegos de sondas se agruparon en seis procesos fisiológicos diversos. Se pudo observar un aumento de expresión de varios genes que codifican enzimas relacionadas con la defensa de las plantas frente a insectos herbívoros y/o patógenos como es el caso de una treonina desaminasa (Gonzales-Vigil y col., 2011), enzima implicada en la degradación del aminoácido esencial treonina y que también se ha relacionado con la respuesta de las plantas frente a estreses abióticos (Joshi y col., 2010); de una neril-difosfato sintetasa 1, implicada en la síntesis de monoterpenos (Schillmiller y col., 2009; Zhang y col., 2013); y de una inhibidora de catepsina D (Lisón y col., 2006); aunque también se observó una menor expresión del gen *PDF1.2* que codifica una defensina (Thomma y col., 2002).

Los datos de los *microarrays* de tomate también mostraron una disminución de la expresión de un gen que codifica una nsHb1, enzima relacionada con la nutrición mineral de las plantas y la asimilación de nitrógeno (Wang y col., 2003), así como de una PEPC, enzima implicada en el metabolismo del carbono con funciones muy diversas como la asimilación del CO₂ atmosférico o la reposición de intermediarios del TCA consumidos durante la biosíntesis y la asimilación de nitrógeno (O'Leary y col., 2011).

8.3. GENES DE PLANTAS DE TOMATE EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RESPUESTA A LOS TRANSFORMATES amdS6 Y amdS122

Un total de 105 juegos de sondas mostraron cambios estadísticamente significativos ($FC \geq 2$ y FDR: 0,1) en su expresión en la interacción de plantas de tomate tanto con el transformante amdS6 como con el amdS122 (Figura 23): seis de ellos (5,8%) aumentaron su expresión (sobrerregulados) y 99 (94,3%) la disminuyeron (infrarregulados) (Tabla 23).

Estos juegos de sondas se agruparon en varios procesos fisiológicos, siendo la transcripción y traducción, la señalización, el metabolismo de carbohidratos y la defensa los procesos más afectados (Tabla 23).

En relación a los procesos de transcripción y traducción, se vieron infrarregulados 15 juegos de sondas, 14 de los cuales correspondieron a factores de transcripción: cinco de tipo WRKY, implicados en la regulación de varios procesos fisiológicos de las plantas como la defensa, la senescencia o el desarrollo de los tricomas (Eulgem y col., 2000); tres de tipo ZPT2, que actúan como represores transcripcionales incrementando la tolerancia de las plantas a diversas condiciones ambientales (Sakamoto y col., 2004); dos con un dominio NAC, que juegan un papel importante no solo en el crecimiento de las plantas sino también en la tolerancia a estreses abióticos y bióticos (Nuruzzaman y col., 2013); dos de respuesta a ET,

activadores de las respuestas de defensa de las plantas (Gu y col., 2002); y otros dos más generales de función desconocida.

Respecto al proceso de señalización, destacó la infrarregulación de cinco juegos de sondas correspondientes a genes que codifican proteínas quinasas, enzimas implicadas en respuestas a diversas señales como la luz, la invasión de patógenos, hormonas, estrés de temperatura o déficit de nutrientes (Stone y Walker, 1995); así como de cuatro juegos de sondas correspondientes a receptores de membrana y proteínas elicitoras relacionados con defensa y resistencia a enfermedad (Ron y Avni, 2004; El Oirdi y Bouarab, 2007).

La relevancia del metabolismo de carbohidratos en la interacción de plantas de tomate con los transformantes *amdS* quedó de manifiesto con la sobrerregulación de cuatro juegos de sondas, dos de los cuales correspondieron a genes que codifican una fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), uno que codifica una PEPC, y otro que codifica una celulasa; y con la infrarregulación de nueve juegos de sondas, correspondientes a genes que codifican diversas enzimas como fosfoglicerato mutasas, deshidrogenasas/reductasas, glicosiltransferasas, endoquitinasas, xiloglican endo-transglicosilasas, invertasas y acetilglucosaminidasas.

También se pudieron observar 12 juegos de sondas infrarregulados relacionados con las respuestas de defensa de la planta frente a distintos microorganismos patógenos como es el caso de homólogos de los genes *hsr203J* y *NtEIG-E80*, que se inducen en la interacción de plantas de tabaco con *Pseudomonas* (Pontier y col., 1994; Takemoto y col., 2003); del gen *enhanced disease susceptibility 1* (*EDS1*) un nodo necesario para la resistencia mediada por receptores de membrana y citoplasmáticos (Hu y col., 2005); de un gen que codifica una proteína de tipo ASC1, encargada de evitar el bloqueo en la síntesis de esfingolípidos inducido por una toxina de *Alternaria* (Spassieva y col., 2002); de otro gen que codifica una proteína de tipo ATL2, que es una ubiquitina ligasa que participa en las vías de señalización de defensa (Serrano y Guzmán, 2004); de un gen que codifica una proteína de tipo PR-5x, relacionada con la respuesta SAR; de genes que codifican proteínas de resistencia a *Verticillium* y *Phytophthora*; o genes que codifican una miraculina, una ATPasa, o una prolil 4-hidrolasa.

En cuanto a la asimilación de nitrógeno, se observó la sobrerregulación de un gen que codifica una nitrato reductasa (NR). Esta enzima cataliza la primera etapa en la reducción de nitrato a nitrito. Dado que el nitrito formado es altamente reactivo y potencialmente tóxico, las células vegetales lo transportan inmediatamente después de ser generado para reducirlo a amonio, gracias a la enzima nitrito reductasa, que también presentó aumentada su expresión en plantas de tomate en interacción con

ambos transformantes, aunque no aparece recogido en la tabla ya que en amdS6 tuvo un FC<2 (1,78). Lo mismo sucedió con el gen que codifica una *nsHb1*, enzima que se induce fácilmente por nitrato, nitrito y óxido nítrico (NO), y que aumentó su expresión en plantas en interacción con el transformante amdS122 con un FC de 3,38, aunque en interacción con amdS6 fue de 1,92.

En la interacción de plantas de tomate con los transformantes también se observó una disminución en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y ácidos grasos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, y el metabolismo secundario y energético, así como de varios genes implicados en transporte, detoxificación, unión a calcio, respuesta hormonal, respuesta a estrés abiótico y procesos postraduccionales.

Tabla 23. Resumen de los juegos de sondas que mostraron diferencias significativas (FC≥2 y FDR: 0,10) de expresión tanto en plantas de tomate en interacción con el transformante amdS6 como en interacción con amdS122 en comparación con plantas control sin *Trichoderma*. Estos juegos de sondas se agruparon en 18 procesos fisiológicos diferentes, y su descripción se basó en su homología con secuencias presentes en la base de datos UNIPROT, empleando el algoritmo BLAST y considerando un valor $E < 10^{-5}$.

Proceso fisiológico	Descripción juegos de sondas	Juegos de sondas sobrerregulados	Juegos de sondas infrarregulados
Metabolismo de carbohidratos	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	2	
	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)	1	
	Endo-1,4- β-glucanasa (celulasa)	1	
	Fosfoglicerato mutasa		1
	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta		1
	Xiloglican endo-transglicosilasa		2
	Glicosiltransferasa		1
	Endoquitinasa		2
	Invertasa		1
	Endo-β-N-acetilglucosaminidasa		1
Metabolismo de lípidos y ácidos grasos	Acil-CoA sintetasa		1
	Fosfolipasa		1
	3-cetoacil-CoA tiolasa		2
Metabolismo de aminoácidos	Prefenato deshidrogenasa		2
	Arogenato deshidratasa		1
	5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa		1
Metabolismo de ácidos carboxílicos	Benzoil-coenzima A: bencil alcohol benzoil transferasa		1
Metabolismo	Tiramina hidroxicinamoil		1

secundario	transferasa		
Metabolismo energético	Alcohol deshidrogenasa		1
Asimilación de nitrógeno	Nitrato reductasa (NR)	1	
Señalización	Receptores/Proteínas elicitoras		4
	Ubiquitina ligasa		2
	Proteína quinasa		5
	Proteína de unión con dominio DC1		1
Transcripción y traducción (síntesis de proteína)	Factores de transcripción		14
	Proteína ribosómica 60S		1
Respuesta hormonal	Proteína de respuesta a auxina		2
	ACC oxidasa		1
	Proteína de respuesta a ABA		1
Defensa	Proteína NtEIG-E80		1
	Proteína HSR203J		1
	Proteína tipo hin1		1
	Miraculina		1
	AAA ATPasa		1
	Proteína de resistencia a <i>Verticillium</i>		1
	EDS1		1
	Proteína ASC1		1
	Proteína ATL2		1
	Proteasa 1 inhibidora de <i>Phytophthora</i>		1
	Proteína relacionada con patogénesis PR-5x		1
	Prolil 4-hidroxilasa		1
Transporte	Iones metálicos		1
	Transportador de hexosas		1
	Transportador de dicarboxilatos		1
	Transportador de lípidos		1
	Intercambiador sodio/hidrógeno		1
	Transportador de proteínas		1
Detoxificación	Citocromo P450 monooxigenasa		2
	Glutación S-transferasa		4
Modificaciones postraduccionales	Metaloproteasa		1
	Aspartil proteasa		1
Unión	Proteínas de unión a calcio		5
Pared celular y membranas	Proteína inhibidora de metilesterasa		1

Respuesta a estrés abiótico	Peroxidasa de pared celular		1
	Dicianina		1
	Proteína rica en N		1
	Proteína de choque térmico		2
Función desconocida		1	11

8.4. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE *Real Time* PCR

Con objeto de confirmar los resultados obtenidos en los *microarrays* de tomate, se realizó un análisis de la expresión, mediante *Real Time* PCR, de algunos genes seleccionados. Para ello, se recogió la parte aérea de plantas de tomate de 3 semanas procedentes de semillas recubiertas con agua (control), con esporas de la cepa silvestre T34 y de los transformantes amdS6 y amdS122 según se describe en el apartado 4.1.2.3 de Materiales y Métodos.

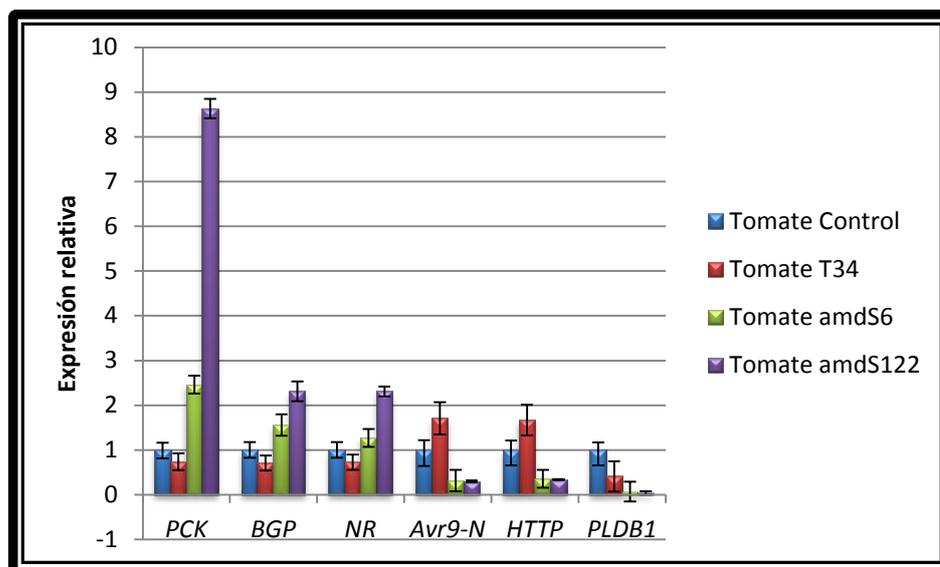


Figura 24. Análisis de la expresión relativa de genes seleccionados mediante *Real Time* PCR. Se empleó la parte aérea de plantas de tomate de 3 semanas procedentes de semillas recubiertas con agua (control), con esporas de la cepa silvestre T34 y de los transformantes amdS6 y amdS122 (apartado 4.1.2.3 de Materiales y Métodos). Como control interno se utilizó el gen de la actina. Como condición basal se utilizó el nivel de expresión detectado para cada uno de los genes en las plantas de tomate sin inocular con *Trichoderma* T34. Se tomó como valor de la condición basal $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$. Abreviaturas de los genes: *PCK*, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*PEPCK*) (AAF19403); *BGP*, endo-1,4- β -glucanasa (AAA69908); *NR*, nitrato reductasa (P17570); *Avr9N*, glicosiltransferasa (AAG43554); *HTTP*, tiramina hidroxicinamoil transferasa (AAL99189) y *PLDB1*, fosfolipasa (AAG45487)

El ARN total, obtenido con el método del TRIZOL[®] (apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos) se retrotranscribió utilizando oligo dT, tal y como se indica en el apartado 7.2.2.2 de Materiales y Métodos. El ADNc así generado se empleó como molde en las

diferentes reacciones de PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos PCK-fw y PCK-rev, para el gen que codifica una PEPCK; BGP-fw y BGP-rev, para el gen que codifica una endo-1,4- β -glucanasa (celulasa); NR-fw y NR-rev, para el gen que codifica una NR; HTTP-fw y HTTP-rev, para el gen que codifica una tiramina hidroxicinamoil transferasa; PLDB1-fw y PLDB1-rev , para el gen que codifica una fosfolipasa; y Avr9N-fw y Avr9N-rev, para el gen que codifica una glicosiltransferasa. Como control interno se utilizó el gen que codifica la actina, usando los oligonucleótidos Actina-fw y Actina-rev. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24.

DISCUSIÓN

Las plantas han desarrollado sistemas de captación de nitrógeno para hacer frente a la disponibilidad heterogénea de este elemento en el suelo. La forma que tienen las plantas para incorporar nitrógeno y transportarlo, a diferentes concentraciones a los distintos órganos, se conoce como “rutas autónomas”, mientras que el nitrógeno aportado por la gran variedad de microorganismos que interactúan y viven en asociación con las plantas se incorpora a las mismas por medio de un mecanismo conocido como “rutas asociadas”. La gran mayoría de estas rutas asociadas tiene lugar en la rizosfera. Las rutas autónomas han sido objeto de frecuente investigación (Vidal y Gutiérrez, 2008; Krouk y col., 2010; Kraiser y col., 2011) y los estudios sobre rutas asociadas, más allá de la fijación de nitrógeno llevada a cabo por la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, han sido más escasos. Posiblemente, la principal adaptación de la planta para asegurar una adecuada adquisición de nitrógeno consiste en modular la arquitectura del sistema radical en respuesta a la disponibilidad de nutrientes nitrogenados (Kraiser y col., 2011) y es bien sabido que las plantas sometidas a altas concentraciones de nitrato o amonio adquieren una alta plasticidad radical, en forma de cambios en el crecimiento de la raíz principal y la proliferación de raíces laterales (Zhang y Forde, 2000).

El nitrógeno y el fósforo se encuentran entre los elementos más limitantes del crecimiento de las plantas, ya que a menudo se hallan en pequeñas cantidades o en una forma que no puede ser utilizada por éstas. Así, muchas especies vegetales han coevolucionado con microorganismos para desarrollar relaciones simbióticas mutualistas, como es el caso de muchos hongos y bacterias del suelo (Morgan y Connolly, 2013).

Investigaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio sirvieron para caracterizar el gen *Thctf1* de *T. harzianum* y analizar su potencial antagonista frente a distintos hongos fitopatógenos (Rubio y col., 2009). Cuando al principio de esta Tesis Doctoral se recubrieron semillas de tomate con cepas que tenían interrumpido este gen, observamos un enorme desarrollo de la raíz principal. En las plantas obtenidas de dichas semillas, podría pensarse que la pérdida de función del factor de transcripción *Thctf1*, relacionado con la síntesis de 6PP (Rubio y col., 2009) podía favorecer el crecimiento de las plantas. Sin embargo, estudios realizados con *T. atroviride* demostraron que las 6PP tenían un efecto positivo sobre la precocidad y desarrollo del sistema radical de plantas de tomate y de colza (Vinale y col., 2008a). Cuando recubrimos semillas de tomate con el mutante de integración ectópica $\Delta J3-16$, que mantenía intacto el gen *Thctf1* pero presentaba el *cassette* de transformación utilizado insertado al azar en su genoma, pudimos observar en las plantas un desarrollo similar al observado en la interacción con los disruptantes $\Delta Thctf1$. Este hecho descartó que la promoción del desarrollo del sistema radical de las plantas de tomate pudiera

deberse a la interrupción del gen *Thctf1*. Analizando qué tenían en común los disruptantes $\Delta Thctf1$ y el mutante $\Delta J3-16$, que no estuviera presente en el genoma de la cepa silvestre, comprobamos que todos ellos expresaban el gen marcador de selección *amdS* de *A. nidulans*, por lo que decidimos llevar a cabo la expresión de este gen en *T. harzianum* T34, de forma más sencilla, sin necesidad de incorporarlo a construcciones para la disrupción de otros genes.

Las amidasas están involucradas en la reducción de compuestos con grupos amido, liberando nitrógeno y carbono (Chebrou y col., 1996). Así, la hidrólisis de acetamida rinde amonio y acetato como productos de reacción. El gen *amdS* de *A. nidulans* ha sido extensamente estudiado (Hynes y Pateman, 1970, Hynes y Davis, 2004), comprobándose que la enzima codificada por este gen presenta actividad hidrolítica sobre amidas alifáticas, como es el caso de acetamida, propionamida, butiramida, valeramida, hexamida, glicolamida y urea (Hynes y Pateman, 1970; Chacko y col., 2009).

Una vez llevada a cabo la inserción satisfactoria del gen *amdS* en el genoma de *T. harzianum* T34, a partir de los resultados obtenidos en un análisis tipo *Southern blot* para varios transformantes, se eligieron las cepas *amdS6* y *amdS122* que contenían una y dos copias del gen, respectivamente. Por otro lado, mediante un análisis de *Real Time PCR*, se comprobó que la cepa silvestre T34 no mostraba expresión del gen, quedando así demostrada la ausencia de genes ortólogos en su genoma. Además, se observó que ambos transformantes presentaban un nivel de expresión proporcional al número de copias que se integraron en sus respectivos genomas.

Al estudiar si la expresión del gen *amdS* en el genoma del hongo afectaba a su fenotipo cuando se crecía en medios de agar suplementados o no con distintas amidas, se pudo observar cómo en todos los casos el crecimiento de los transformantes fue significativamente mayor que el de la cepa silvestre T34, excepto en acrilamida. El análisis fenotípico de los transformantes se completó con un estudio de esporulación. La producción de conidios es un proceso fisiológico que se ha relacionado con la respuesta a falta de nutrientes en distintas especies de *Trichoderma*, como un reto importante para su supervivencia (Mukherjee y col., 2003; Carreras-Villaseñor y col., 2005). La detección de menor esporulación en los transformantes podría ser indicativo de que el gen *amdS* es capaz de hidrolizar amidas para utilizarlas como fuente de nitrógeno y carbono en su propio beneficio. Además, las amidas tóxicas podrían ejercer un efecto negativo sobre el crecimiento y un aumento de la esporulación en la cepa silvestre, efecto contrario al observado en las colonias de los dos transformantes *amdS*. Sin embargo, el hecho de que se detectara mayor crecimiento micelial y menor esporulación en las colonias de los transformantes *amdS* crecidas en PDA, respecto a la cepa silvestre, podría explicarse por la propia composición de este medio indefinido y

por la presencia de algún componente del medio susceptible de ser hidrolizado por la enzima amdS. En las placas suplementadas con acetamida se observaron cambios en la pigmentación cuando se inocularon con los transformantes amdS, en comparación con la cepa silvestre T34. Este hecho podría explicarse por la basificación del medio provocada por el amonio liberado como consecuencia de la actividad amidasa.

La funcionalidad de la amidasa en *T. harzianum* también se constató, en cultivos de PDB suplementados con acetamida, acrilamida, formamida y urea. Interesantemente, T34 presentó menor crecimiento micelial en urea y proporcionalmente fue en este medio en el que los dos transformantes presentaron mejor comportamiento. Además, la mayor subida de pH detectada en cultivos de los dos transformantes se observó en PDB suplementado con acetamida, formamida y urea. El comportamiento en medio líquido fue similar al detectado en cultivos en medio sólido, pese a que cabría esperar que el amonio liberado al medio por la actividad amidasa fuera consumido rápidamente por el micelio del hongo. Por otro lado, el medio PDB es un medio indefinido que contiene extracto de patata, con moléculas que contienen grupos amido, susceptibles de ser hidrolizados por la enzima amdS. Además, se realizó un ensayo de liberación de amonio al medio en estos mismos cultivos. Aunque los dos transformantes fueron capaces de liberar más amonio que la cepa silvestre en PDB solo, la proporción del amonio liberado entre los transformantes y la cepa silvestre fue mayor en los cultivos suplementados con amidas, excepto con acrilamida. Esta excepción podría deberse al carácter tóxico de este compuesto, incapaz de soportar el crecimiento microbiano cuando se utiliza como fuente única de carbono o de nitrógeno (Miller y Gray, 1982).

No se detectaron diferencias en el potencial de biocontrol entre la cepa silvestre y los transformantes amdS. Esto nos hizo pensar que la expresión de este gen en *T. harzianum* no alteraba la actividad antagonista del hongo, pudiendo estar más relacionado con la capacidad fisiológica para hidrolizar sustratos con grupos amido y la mejora en la disponibilidad de nutrientes nitrogenados más fácilmente asimilables.

La evaluación de los transformantes amdS6 y amdS122 en su interacción con plántulas de tomate de 5 días se realizó *in vitro* en placas con medio MS y 4 días después de inocular las cepas de *Trichoderma*. Como cabía esperar, se produjo un incremento significativo de la longitud de la parte aérea de las plántulas de tomate inoculadas con la cepa T34 respecto a las plántulas sin inocular. Son muchos los ejemplos sobre la capacidad de *Trichoderma* para promover el crecimiento de las plantas en general (Shoresh y col., 2010; Hermosa y col., 2012) y de las plantas de tomate en particular (Marra y col., 2006; Tucci y col., 2011). En este mismo ensayo las plántulas inoculadas con los transformantes amdS6 y amdS122 fueron, a su vez, significativamente más grandes que las inoculadas con la cepa silvestre T34. Este

hecho podría deberse a una mayor disponibilidad de nutrientes, como nitrógeno por vía asociativa, en las plántulas inoculadas con las cepas con actividad amidasa. Desafortunadamente el propio diseño experimental no nos permitió disponer de raíces con un tamaño suficiente para ser extraídas del medio sin romperse y poder ser evaluadas en este ensayo.

Se llevó a cabo un ensayo *in vivo* en invernadero con plantas de tomate de 3 semanas cuyas semillas habían sido recubiertas con esporas de *Trichoderma*. Las medidas de longitud de la parte aérea y de la raíz sirvieron para constatar un comportamiento de las plantas similar al observado en el ensayo *in vitro*. Las plantas procedentes de semillas inoculadas con *Trichoderma* fueron significativamente mayores que las no inoculadas, y la aplicación de los transformantes amdS6 y amdS122 a las semillas dio lugar a plantas con un tamaño de tallo y de raíz significativamente mayor que las plantas procedentes de semillas recubiertas con la cepa silvestre T34. Esta observación relaciona la promoción del crecimiento de la parte aérea y de la raíz con una mayor actividad amidasa, capaz de facilitar la disponibilidad de nutrientes más fácilmente asimilables, y confirma el modelo de alta plasticidad radical asociado a altas concentraciones de amonio en el medio, con aumento del crecimiento de la raíz principal (Zhang y Forde, 2000). Estos resultados también son compatibles con el marcado desarrollo de la raíz principal, detectada al comienzo de esta Tesis Doctoral, en plantas de tomate inoculadas con los disruptantes Δ Thctf1 y el mutante de integración ectópica Δ J3-16.

El uso de nitrógeno por las plantas implica varios pasos que podrían dividirse en: captación, asimilación, traslocación y reutilización. Sin embargo, estos procesos son altamente dependientes de una fuente de carbono suficiente que permita a las plantas captar sólo el nitrógeno que puedan utilizar. Está demostrado que los niveles de nitrógeno pueden afectar significativamente la fijación autotrófica de carbono (Reich y col., 2006). El nitrato y el amonio absorbido por las raíces llega hasta las hojas, a la vez que éstas fijan carbono fotosintéticamente, dando lugar a un equilibrio coordinado C/N a través de la incorporación del nitrógeno a las enzimas fotosintéticas (Zheng, 2009). Cuando se acumula suficiente nitrógeno en la planta, está demostrado que se almacena en grandes cantidades formando parte de proteínas fotosintéticas, como rubisco y PEPC, y que un descenso en la asimilación y almacenamiento de nitrógeno provocará una disminución de la cantidad total de CO₂ captado fotosintéticamente (Nunes-Nesi y col., 2010).

La mayor parte del nitrógeno está presente en las plantas formando moléculas con un estado de oxidación III, como el amoníaco, y se encuentra incorporado a proteínas, ácidos nucleicos y otras muchas biomoléculas. Durante el crecimiento autotrófico la demanda de nitrógeno se suple con la aportación de nitrógeno

inorgánico, a través de dos rutas alternativas: la fijación de nitrógeno molecular del aire y la asimilación de nitrato o amonio presentes en el agua o en el suelo. *Trichoderma* incrementa el NUE en las plantas (Shoresh y col., 2010) y esta habilidad se constató en plantas de maíz desarrolladas a partir de semillas tratadas con *T. harzianum*, en suelos con baja concentración de nitrógeno. Estas plantas fueron capaces de incrementar su rendimiento hasta alcanzar un punto en el que la fertilización con nitrógeno no aumentaba la producción del cultivo, presumiblemente porque las plantas disponían de más nitrógeno del que podían utilizar (Harman, 2000). Tras esta observación, se realizaron ensayos con otras cepas y especies de *Trichoderma*, preferiblemente a nivel de invernadero, comprobándose que plantas tratadas con este hongo incrementaban su contenido en nitrógeno y que además un aumento de los niveles celulares de este elemento estuvo acompañado de mayor rendimiento de los cultivos (Shoresh y col., 2010). En consonancia con estos resultados, en nuestros ensayos los niveles de nitrógeno y carbono en plantas de tomate colonizadas con *T. harzianum* fueron superiores a los detectados en las plantas control y éstos fueron aún mayores en las plantas inoculadas con los dos transformantes amdS6 y amdS122.

Para conocer cómo la expresión del gen *amdS* en *T. harzianum* afecta a su interacción con las plantas realizamos un análisis transcriptómico hibridando *microarrays* comerciales que contenían 9.254 transcritos de tomate, que sirvieron para comparar la expresión génica en plantas de 21 días, provenientes de semillas recubiertas con los transformantes amdS o *T. harzianum* T34, usando como condición control plantas de tomate sin *Trichoderma*. El límite de significación estadística ($FC \geq 2$ y FDR: 0.1) puede considerarse suficiente por haber sido válido en estudios previos realizados en el transcriptoma de tomate (Ruzicka y col., 2010; Shi y col., 2013).

Bajo estas condiciones, solamente nueve genes mostraron variaciones en sus perfiles de expresión en tomate en interacción con T34 respecto al tomate control. A este respecto, se observó la sobreexpresión del gen de la treonina desaminasa, una enzima que codifica el paso de treonina a α -cetobutirato, liberando amonio en la síntesis de isoleucina; su importante aumento de expresión en hojas después del ataque de un herbívoro sugiere su implicación en respuestas de defensa (Kang y col., 2006; Gonzales-Vigil y col., 2011). La susceptibilidad a herbívoros se ha visto asociada a bajos niveles de JA y de conjugado JA-isoleucina (JA-Ile), por lo que la treonina desaminasa proporciona isoleucina para la formación de JA-Ile y el aumento de resistencia a insectos (Kang y col., 2006). Este gen también ha demostrado estar altamente inducido en frutos de tomate por el ataque de *B. cinerea* (Cantu y col., 2009) y en la parte aérea por infección con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Balaji y col., 2008). También aumentaron su expresión tres genes con función desconocida. Estudios previos han demostrado que uno de estos genes se

expresaba fuertemente en plántulas de tomate en presencia de nanotubos de carbono (Khodakovskaya y col., 2011), así como en frutos infectados por *B. cinerea* o dañados por heridas (Cantu y col., 2009) y en respuesta al viroide *Potato Spindle Tuber* (Owens y col., 2012); y otro de los genes respondía fuertemente a estrés por calor (Upadhyay y col., 2014) y al ataque de *B. cinerea* (Cantu y col., 2009). También se observó la sobrerregulación de un gen relacionado con la producción de nerol, un precursor en la síntesis de monoterpenos (Schillmiller y col., 2009) implicados indirectamente en funciones de defensa, bien como moléculas activas para atraer predadores de insectos herbívoros o como repelentes de este tipo de atacantes (Zhang y col., 2013), aunque también tienen muchas otras funciones en las plantas.

Los tres genes infrarregulados en plantas de tomate procedentes de semillas tratadas con T34 fueron el gen *PDF1.2*, marcador típico de respuestas de defensa mediadas por JA, el gen *nsHb1* relacionado con la asimilación de nitrógeno, y un gen que codifica una PEPCK que es una enzima reversible que cataliza la descarboxilación de oxalacetato (OAA) a fosfoenolpiruvato (PEP) y CO₂, el primer paso de la ramificación de los intermediarios del TCA hacia la gluconeogénesis de lípidos y proteínas (Osorio y col., 2013). Interesantemente, este gen estaba sobrerregulado en plantas procedentes de semillas recubiertas con esporas de los transformantes *amdS*, al igual que el gen *nsHb1* (en *amdS6* con un FC<2), o lo que es lo mismo, estos genes mostraron un aumento en su expresión en presencia de más amonio disponible en el medio.

Las hemoglobinas son proteínas, implicadas en muchas reacciones de óxido-reducción. En animales actúan como transportadores de oxígeno y además, en otros organismos, desde plantas a bacterias, intervienen en la regulación de numerosos procesos metabólicos, como el estrés nitrosativo, por medio de la modulación de los niveles de NO (Hill, 2012). En plantas existen hemoglobinas simbióticas, descritas en interacciones *Rhizobium*-leguminosa (Nagata y col., 2008) y hemoglobinas no simbióticas identificadas a partir de especies dicotiledóneas y monocotiledóneas fijadoras y no fijadoras de nitrógeno (Bogusz y col., 1988; Trevaskis y col., 1997; Rodríguez-Alonso y Arredondo-Peter, 2013). Las *nsHb1* están relacionadas con el desarrollo de la planta y la morfogénesis. Eventos activados por NO, como el incremento del número de raíces laterales y de pelos radicales (Correa-Aragunde y col., 2006; Fernández-Marcos y col., 2011), son atenuados por *nsHb1* (Hebelstrup y col., 2013), ya que esta proteína es capaz de secuestrar NO y disminuir el estrés provocado por la acumulación de niveles tóxicos de este compuesto nitrogenado (Liu y col., 2013). La sobrerregulación de *nsHb1* está relacionada con la disponibilidad de nitrógeno en el medio y se ha descrito que guarda relación con la inducción de NR (Ohwaki y col., 2005). La bajada de NO provocada por *nsHb1* implica una disminución de SA y por tanto del poder antagonico de esta hormona sobre JA (Mur y col., 2013a). En nuestro caso, hemos observado que el aumento de tamaño de la raíz principal de

plantas de tomate colonizadas por los transformantes de *T. harzianum* que expresan el gen *amdS* es compatible con un aumento de la expresión de *nsHb1*, con una subsiguiente disminución de los niveles de NO. Además, el aumento de expresión de *nsHb1* irá acompañado de la bajada de los niveles de ET y de ABA, así como de un aumento en la producción de giberelinas, conllevando un incremento en el crecimiento de la planta, lo que sería compatible con el modelo de interacción planta-*Trichoderma* propuesto por Hermosa y col (2012). Resulta interesante resaltar que las citoquininas actúan también como supresores de NO (Liu y col., 2013), por lo que el papel de estas fitohormonas, unido al NUE facilitado por *Trichoderma*, posibilita la aparición de nuevos actores en el entendimiento de las respuestas beneficiosas inducidas por *Trichoderma* en plantas. Por otro lado, el hecho de que la expresión de transportadores de nitrato no se vea modificada en plantas colonizadas por los transformantes *amdS* de *Trichoderma* confirma la existencia de NUE, ya que hay menor afinidad por nitrógeno cuando éste se encuentra a una concentración elevada y el déficit de nitrato induce la expresión de genes relacionados con su proceso de transporte (Tsay, 2014).

Como ya se ha mencionado, *nsHb1* modula el metabolismo del nitrógeno y el gen *nsHb1* se induce fuertemente por nitrato, nitrito y NO (Ohwaki y col., 2005). Ya que nitrito y NO son moléculas potencialmente tóxicas para las plantas, cabría pensar que la inducción de *nsHb1* podría tener una función detoxificante de estos metabolitos. No obstante, se ha sugerido que *nsHb1* no está implicado en la abolición del estrés nitrosativo por acumulación de NO como resultado de la HR de la planta (Molassiotis y Fotopoulos, 2011). Las funciones de señalización mediadas por NO son necesarias para llevar a cabo una respuesta de defensa adecuada (Perazzolli y col., 2004); y la sobrerregulación de *nsHb1* en plantas inoculadas con los transformantes *amdS* podría guardar relación con el proceso de colonización, sin descartar la influencia que tiene el aumento de los niveles de amonio como resultado de la actividad enzimática de estas cepas de *Trichoderma*.

Interesantemente, la colonización endofítica de las raíces por hongos beneficiosos como *P. indica* o *Trichoderma* spp. estimula en la planta la expresión de genes que codifican NRs y este aumento de expresión va acompañado de NUE y de un incremento del desarrollo (Sherameti y col., 2005; Bae y col., 2009). Por el contrario, las plantas micorrizadas presentan un aumento de la NR en el hongo y una bajada de expresión de este mismo gen en la planta, ya que la mayor parte del nitrógeno es asimilado en forma de aminoácidos (Kaldorf y col., 1998). Teniendo en cuenta que los mutantes *amdS* parecen proporcionar suficiente amonio a la planta, ésta no necesitaría un mayor aporte de nitrógeno que conlleve un aumento de la expresión del gen que codifica la enzima NR, por lo que cabría esperar que la mayor expresión de este gen en plantas colonizadas por los transformantes *amdS* de *Trichoderma* podría

deberse a la regulación o al aumento de los niveles de SA, a través de la producción de NO, que serviría para controlar la colonización endofítica de las cepas de *Trichoderma* (Mur y col., 2013a; 2013b). Por otro lado, la señalización por NO incluye procesos complejos en los que el calcio citosólico se ve incrementado (Besson-Bard y col., 2008). Una explicación de este aumento podría hallarse en la necesidad que tienen las plantas de compensar con otros iones la competencia catiónica generada por el aumento de amonio (Sonneveld y Voogt, 2009).

La regulación coordinada de los genes *nsHb1* y *NR* podría desempeñar un papel de árbitro en la interconexión de las cascadas de señalización de respuestas de defensa (Mur y col., 2013a). Si bien es cierto que la actividad NR favorece la generación de NO, que a su vez provocaría un aumento de la expresión de *nsHb1*, la enzima NR es un componente principal del metabolismo del nitrógeno y la reducción coordinada de nitrato a nitrito por esta enzima, junto con la posterior conversión de nitrito en aminoácidos, está controlada por el metabolismo mitocondrial del malato, que funciona como fuente de carbono para las reacciones anapleróticas del ciclo TCA y es un facilitador de equivalentes reducidos para la reducción y asimilación de nitrato. Precisamente, la síntesis y oxidación de malato está regulada por la enzima PEPC, que también se mostró sobrerregulada, que es una enzima que, como ya se ha dicho, actúa como proteína para almacenar nitrógeno y cataliza la reacción reversible de PEP a OAA que, al ser reducido a malato, desempeña un papel crucial en la fijación de CO₂ y la reposición anaplerótica de intermediarios del ciclo TCA consumidos en procesos de biosíntesis y asimilación de nitrógeno (O'Leary y col., 2011). Se regula así el flujo de carbono en los tejidos de plantas vasculares que asimilan nitrógeno de forma activa, específicamente cuando la fuente principal es amonio (Masumoto y col., 2010).

Como ya se ha mencionado, PEPC es una enzima reversible que cataliza la descarboxilación de OAA a PEP y CO₂, el primer paso de la ramificación de los intermediarios del ciclo TCA hacia la gluconeogénesis de lípidos y proteínas (Osorio y col., 2013). Se ha comprobado que PEPC está fuertemente inducida por el aporte de nitrato, amonio y asparragina a la planta (Delgado-Alvarado y col., 2007) y que los mayores niveles de acumulación de PEPC han coincidido con la máxima abundancia de dos enzimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos (asparragina aminotransferasa mitocondrial y alanina aminotransferasa citosólica) y con la máxima producción de acetil-CoA carboxilasa, enzima relacionada con el almacenamiento de lípidos (Walker y col., 1999). También se ha propuesto que PEPC desempeña un papel importante en el metabolismo de aminoácidos, ya que está implicada en la conversión del esqueleto carbonado de asparragina/aspartato (OAA) al de glutamato/glutamina (2-oxoglutarato), de especial relevancia en el transporte interno de estas moléculas en la planta (Lea y col., 2001). Por lo que la sobrerregulación PEPC en las plantas de tomate inoculadas con los transformantes *amdS* es coherente con el incremento de la

disponibilidad de amonio en la rizosfera tras la inoculación de estos mutantes con actividad amidasa.

Muchos de los genes que tenían disminuida su expresión, guardaron relación con respuestas de defensa: algunos factores de transcripción, genes que codifican proteínas quinasas, genes correspondientes a PRR y NBS-LRR, proteínas elicitoras, etc. La marcada bajada de la expresión de genes de defensa en plantas inoculadas con los transformantes *amdS* se vio acompañada por un aumento del crecimiento de las mismas. Esta respuesta transcriptómica guardó relación con el modelo de compensación defensa-crecimiento propuesto por Hermosa y col. (2013), que explica las distintas respuestas de la planta en su interacción con *Trichoderma*.

Los hongos y oomicetos poseen en sus genomas un elevado número de genes que codifican pequeñas proteínas secretadas ricas en cisteínas (SSCPs). Se han descrito varias proteínas SSCP del tipo ceratoplataninas en los genomas de *Trichoderma* spp. (Kubicek y col., 2011). *T. harzianum* y *T. atroviride* son capaces de secretar proteínas SSCP homólogas a las proteínas Avr4 y Avr9 del patógeno de tomate *C. fulvum*. Avr9 es un elicitor con homología estructural, pero no funcional, con inhibidores de carboxipeptidasas fuertemente inducidos bajo limitación de nitrógeno y su reconocimiento por receptores PRR de la membrana de la planta da lugar al aumento de expresión del gen *EDS1* necesario para la resistencia mediada por receptores NBS-LRR citoplasmáticos, y a una subsiguiente HR y acumulación de SA (Hu y col., 2005; Stergiopoulos y De Wit, 2009). Se ha comprobado que existe una fuerte disminución de la expresión de *EDS1* en hojas de *Arabidopsis* 4 horas después de la inoculación con *T. harzianum* y que esta respuesta persiste a las 24 horas, con un incremento de la expresión de éste y otros genes de defensa después de 48 horas (Morán-Díez y col., 2012). Nuestro resultado estaría de acuerdo con la necesidad que tiene *Trichoderma* de contrarrestar la defensa de la planta dependiente de SA para tener éxito en la colonización de la raíz (Alonso-Ramírez y col., 2014) y sería indicativo de que una reducción de la MTI dependiente de SA facilita la colonización del tejido radical por *Trichoderma*. En esta Tesis Doctoral, los niveles de expresión de genes relacionados con la defensa dependiente de SA son menores en plantas tratadas con *Trichoderma* que en el control, siendo este resultado compatible con la necesidad de la planta de economizar y equilibrar los estímulos recibidos por *Trichoderma* en forma de crecimiento e inducción de defensas, indicado más arriba (Hermosa y col., 2013). Por otro lado, las respuestas dependientes de SA y de JA o JA/ET presentan un comportamiento ondulante en tomate (capítulo 2 de esta Tesis Doctoral) y son compatibles con las fases temporales de señalización hormonal descritas previamente en *Arabidopsis* (Truman y col., 2010). La dinámica de transcripción de la respuesta inmune de las plantas es enormemente compleja y el solapamiento de genes que se inducen o reprimen en función de cascadas y pulsos que reprograman esa

transcripción varía, además, en función del tipo de estrés y microorganismo al que se enfrenten (Moore y col., 2011). La inclusión en este escenario del metabolismo del nitrógeno y el NUE por parte de la planta añade más complejidad a los modelos existentes, pero es seguro que la consideración de estos y otros nuevos actores que, como GABA (Bouché y Fromm, 2004) o el ácido β -aminobutírico (BABA) (Schwarzenbacher y col., 2014), contribuyen a la captación de nutrientes, al balance C/N, a la señalización de respuestas de defensa y a la regulación del crecimiento, facilitará el entendimiento de la interacción *Trichodema*-planta y ayudará al desarrollo de nuevos y mejores productos basados en este microorganismo beneficioso para la agricultura.

CONCLUSIONES

Trichoderma es un género de hongos con demostrado interés biotecnológico, siendo la aplicación más conocida la derivada de sus propiedades como agentes de control biológico en agricultura. No obstante, estos hongos también mantienen con las plantas una relación mutualista, con probados ejemplos de cómo dicha relación resulta beneficiosa para la planta, pero no tantos de los resultados positivos para *Trichoderma*, más allá del valor del mucigel como nutriente y de las raíces como sitio de colonización endofítica. En esta Tesis Doctoral, he querido abordar el estudio de los cambios transcriptómicos que se producen en tres cepas de *Trichoderma*, pertenecientes a especies acreditadas como agentes de biocontrol, durante su interacción con plantas de tomate. Así como los que se producen en una cepa de *T. parareesei*, una nueva especie descrita en Austria durante la realización de esta Tesis Doctoral, que está muy alejada taxonómicamente de las anteriores, y cuyo potencial de biocontrol ha sido demostrado en nuestro laboratorio. También he abordado, por medio de transformantes heterólogos de *T. harzianum* que expresan el gen *amdS*, que codifica una amidasa de *A. nidulans*, el papel de este gen en fertilización, mediante el uso eficiente de nitrógeno, y en la transcripción de genes relacionados con la modulación de las respuestas de defensa y desarrollo de plantas de tomate tras haber sido colonizadas por *Trichoderma*.

A continuación se indican las conclusiones más relevantes de esta Tesis Doctoral:

1. En estadios tempranos de la interacción *Trichoderma*-tomate, los efectos observados en el desarrollo de las plántulas varían en función de la cepa de *Trichoderma*. *T. hamatum* T7, *T. harzianum* T34 y *T. parareesei* T6 mostraron un efecto positivo en el desarrollo de las plantas respecto al control, mientras que *T. virens* T87 tuvo un efecto negativo.
2. Las respuestas transcriptómicas de *Trichoderma* a la presencia de plantas de tomate en el medio también depende de la cepa. En *T. hamatum* T7, *T. harzianum* T34 y *T. virens* T87 se observó una activación significativa del metabolismo de carbohidratos, mientras que en *T. parareesei* T6 se detectó una disminución, indicando que, en comparación con las otras cepas, T6 permanece de alguna manera inactiva metabólicamente en etapas tempranas de interacción con la planta. La menor capacidad de transporte celular observada en *T. hamatum* T7 y *T. parareesei* T6 es indicativa de una captación de nutrientes limitada para ambas cepas en las condiciones experimentales analizadas.
3. El gen que codifica la proteína TCTP/P23 aumentó su expresión en *T. hamatum* y *T. harzianum*, especies que promovieron el crecimiento de las plantas, a

Conclusiones

- diferencia de *T. virens*. Este hecho podría relacionarse con un crecimiento activo de las hifas de estas dos especies en el contacto con las raíces de tomate.
4. El alto número de juegos de sondas infrarregulados relacionados con hidrofobinas que mostró *T. virens* en interacción con plantas de tomate podría indicar que, bajo las condiciones experimentales de nuestro estudio, esta especie presenta una capacidad limitada de unión a las raíces, hecho que afectaría a su capacidad para promover el crecimiento de las plantas.
 5. El gen que codifica la proteína ThPG1, cuya implicación en la colonización de la raíz y en las respuestas beneficiosas para las plantas ha sido previamente demostrada, aumentó su expresión en *T. parareesei* T6, lo que podría explicar el efecto positivo de esta cepa en el desarrollo de plantas de tomate.
 6. Precisamente, este efecto positivo de *T. parareesei* T6 sobre tomate, junto con su capacidad antagonista previamente descrita, sugieren que esta especie podría ser útil para la protección de las plantas, como agente de biocontrol y/o como microorganismo beneficioso para las mismas. Sin embargo, debido a que la temperatura óptima de crecimiento de esta especie es de 37°C, similar a la de la mayoría de los microorganismos patógenos humanos, se necesitarán estudios de evaluación del riesgo para su aplicación en sistemas abiertos, principalmente en agricultura.
 7. La baja expresión relativa de genes de la planta relacionados con las rutas de señalización de SA en las primeras horas de interacción con *Trichoderma*, y su aumento de expresión en las horas siguientes, sirven de apoyo a los resultados que indican que esta fitohormona modula la colonización de la raíz por parte de *Trichoderma*, estando de acuerdo estos perfiles con la limitación del hongo a los espacios intercelulares de epidermis y córtex de la raíz. Además, se ha comprobado cómo una vez establecida la interacción hongo-planta, la colonización por parte de *Trichoderma* dispara una respuesta sistémica, señalizada por JA/ET, y que estas respuestas de defensa son ondulantes, con alternancia SA/JA, disminuyendo su intensidad a lo largo del tiempo.
 8. Los niveles de transcrito del gen *amdS* de *A. nidulans* detectados en los transformantes de *T. harzianum* T34 indican que el gen se ha integrado en el genoma de dicha cepa. Los resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos y en los ensayos de liberación de amonio muestran además que los transformantes son capaces de hidrolizar acetamida, formamida y urea, demostrando una actividad amidasa.
 9. Las diferencias observadas en el transcriptoma de plantas de tomate tratadas con la cepa *T. harzianum* T34, respecto al de plantas sin tratar, indican que, bajo las condiciones experimentales analizadas, el transcriptoma de la planta se ve muy poco modificado por la presencia de este hongo.
 10. El gran número de genes relacionados con respuestas de defensa que disminuyeron su expresión en plantas tratadas con los transformantes *amdS*,

junto con el mayor desarrollo observado en las mismas, está de acuerdo con el modelo de compensación defensa-crecimiento propuesto para la interacción *Trichoderma*-planta.

11. El gen *amdS* expresado en *T. harzianum* actúa de manera positiva en el crecimiento de las plantas. Esto puede ser debido a una mayor disponibilidad de amonio que conlleva un aumento significativo de los niveles de nitrógeno total en la planta, debido a la mejora del uso eficiente de este elemento en las plantas colonizadas por los transformantes *amdS*.

BIBLIOGRAFÍA

Alfano, G., Lewis Ivey, M. L., Cakir, C., Bos, J. I. B., Miller, S. A., Madden, L. V., Kamoun, S. y Hoitink, H. A. J. (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* **97**: 429-437.

Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E. y Nicolás, C. (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Molecular Plant Pathology* **15**: 823-831.

Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. y Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2926-2933.

Arvas, M., Pakula, T., Lanthaler, K., Saloheimo, M., Valkonen, M., Suortti, T., Robson, G. y Penttilä, M. (2006). Common features and interesting differences in transcriptional responses to secretion stress in the fungi *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* **22**: 7-32.

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. y Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* **25**: 25–29.

Askolin, S., Penttilä, M., Wösten, H. A. y Nakari-Setälä (2005). The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development. *FEMS Microbiology Letters* **253**: 281-288.

Atanasova, L., Jaklitsch, W. M., Komon-Zelazowska, M., Kubicek, C. P. y Druzhinina, I. S. (2010). Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulose producer *Hypocrea jecorina/T. reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 7259-7267.

Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P. y Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* **14**: 121.

Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S.-H., Strem, M. D., Melnick, R. L. y Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3279-3295.

Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., Samuels, G. J., Choi, I.-Y. y Holmes, K. A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* **224**: 1449-1464.

Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I. y Sessa, G. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology* **146**: 1797-809.

Balaji, V., Arulazhagan, P. y Ebenezer, P. (2014). Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of Environmental Biology* **35**: 521-529.

Bibliografía

Banerjee, A., Sharma, R. y Banerjee, U. C. (2002). The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**: 33-44.

Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* **22**: 87-108.

Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A. y Wendehenne, D. (2008). Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Molecular Plant* **1**: 218-228.

Benhamou, N. y Chet, I. (1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2095-2099.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* **7**: 249-260.

Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistical Society* **57**: 289-300.

Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* **60**: 2357-2372.

Björkman, T. (2004). Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. *Plant Growth Regulation* **43**: 89-92.

Bogusz, D., Appleby, C. A., Landsmann, J., Dennis, E. S., Trinick, M. J. y Peacock, W. J. (1988). Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. *Nature* **331**: 178-180.

Bolar, J. P., Norelli, J. L., Harman, G. E., Brown, S. K. y 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 Research* **10**: 533-543.

Bonaccorsi, E. D., Ferreira, A. J., Chambergo, F. S., Ramos, A. S., Mantovani, M. C., Farah, J. P., Sorio, C. S., Gombert, A. K., Tonso, A. y El-Dorry, H. (2006). Transcriptional response of the obligatory aerobic *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen. *Biochemistry* **45**: 3912-3924.

Bouché, N. y Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in Plant Science* **9**: 110-115.

Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. y Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology* **147**: 779-789.

Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Tohge, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A. y Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogen* **9**: e1003221.

Bruce, T. J. A. y Pickett, J. A. (2007). Plant defence signalling induced by below and above ground attacks. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 387-392.

- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S. y Kubicek, C. P. (2003).** The Nag1 *N*-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current Genetics* **43**: 289-295.
- Cantu, D., Blanco-Ulate, B., Yang, L., Labavitch, J. M., Bennett, A. B. y Powell, A. L. T. (2009).** Ripening-regulated susceptibility of tomato fruit to *Botrytis cinerea* requires NOR but not RIN or ethylene. *Plant Physiology* **150**: 1434-1449.
- Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., Vizcaíno, J. A., González, F., Llobell, A., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2007).** Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 269-283.
- Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., Vizcaíno, J. A., Sanz, L., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2005).** Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. En *Microorganism for Industrial Enzymes and Biocontrol*, pp.1-22. Eds.: E. Mellado y J. L. Barredo. Researchs Signpost, Kerala, India.
- Cardoza, R. E., Malmierca, M. G., Hermosa, R., Alexander, N. J., McCormick, S. P., Proctor, R. H., Tijerino, A. M., Rumbero, A., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2011).** Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthesis genes in filamentous fungi of the genus *Trichoderma*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 4867-4877.
- Cardoza, R. E., Vizcaíno, J. A., Hermosa, M. R., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2006).** A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. *Journal of Microbiology* **44**: 383-395.
- Carpenter, M. A., Stewart, A., Ridgway, H. J. (2005).** Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridisation. *FEMS Microbiology Letters* **251**: 105-112.
- Carreras-Villaseñor, N., Sánchez-Arrenguin, J. A. y Herrera-Estrella, A. H. (2005).** *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* **158**: 3-16.
- Cazalè, A. C., Clément, M., Chiarenza, S., Roncato, M. A., Pochon, N., Creff, A., Marin, E., Leonhardt, N. y Noël, L. D. (2009).** Altered expression of cytosolic/nuclear HSC70-1 molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2653-2664.
- Chacko, S., Ramteke, P. W. y John, S. A. (2009).** Amidase from plant growth promoting rhizobacterium. *African Journal of Bacteriology Research* **1**: 46-50.
- Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A. y Delgado-Jarana, J. (2007).** Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology* **10**: 19-27.
- Chambergo, F. S., Bonaccorsi, E. D., Ferreira, A. J., Ramos, A. S., Ferreira Junior, J. R., Abrahao-Neto, J., Farah, J. P. y El-Dorry, H. (2002).** Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 13983-13988.

Bibliografía

Chebrou, H., Bigey, F., Arnaud, A. y Galzy, P. (1996). Study of the amidase signature group. *Biochimica et Biophysica Acta* **1298**: 285-293.

Chen, L., Yang, X., Raza, W., Li, J., Liu, Y., Qiu, M., Zhang, F. y Shen, Q. (2011). *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**: 1653-1663.

Chet, I. (1987). *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as a biocontrol agents of soilborne plant pathogenic fungi. En *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, pp. 137-160. Eds.: I. Chet. Urilley y Sods, Nueva York, EE.UU.

Chet, I., Harman, G. E. y Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology* **7**: 29-38.

Chet, I. e Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **48**: 37-43.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. y Staskawick, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-814.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R. y López-Bucio, J. (2014). *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 503-514.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Pango, C. y López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **149**: 1579-1592.

Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, C. y Lamattina, L. (2006). Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany* **57**: 581-588.

Daejung, K., Jiyoung, K., Jung, N. C., Kwang-Hyeon, L. y Choong, H. L. (2011). Chemotaxonomy of *Trichoderma* spp. using mass spectrometry-based metabolite profiling. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **1**: 5-13.

Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B. y Grafe, U. (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *Journal of Peptide Science* **9**: 666-678.

de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H. A. J. y Thomma B. P. H. J. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**: 953-955.

de la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benítez, T., Pintor-Toro, J. A. y Llobell, A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry* **206**: 859-867.

- Delgado-Alvarado, A., Walker, R.P. y Leegood, R. C. (2007).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive. *Plant Cell & Environment* **30**: 225-235.
- Delgado-Jarana, J., Sousa, S., Gozález, F., Rey, M. y Llobell, A. (2006).** *ThHog1* controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* **152**: 1687-1700.
- Demain, A. L. y Fang, A. (2000).** The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **69**: 1-39.
- Devi, T. P., Kulanthaivel, S., Kamil, D., Borah, J. L., Prabhakaran, N. y Srinivasa, N. (2013).** Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma* species. *Indian Journal of Experimental Biology* **51**: 543-547.
- Diener, S. E., Dunn-Coleman, N., Foreman, P., Houfek, P. J. M., Teunissen, P., van Solingen, L., Dankmeyer, L., Mitchell, T. K., Ward, M. y Dean, R. A. (2004).** Characterization of the protein processing and secretion pathways in a comprehensive set of expressed sequence tags from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters* **230**: 275-282.
- Distefano, G., La Malfa, S., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z. y Gentile, A. (2008).** Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research* **17**: 873-879.
- Dixit, P., Mukherjee, P. K., Sherkhane, P. D., Kale, S. P. y Eapen, S. (2011).** Enhanced tolerance and remediation of anthracene by transgenic tobacco plants expressing a fungal glutathione transferase gene. *Journal of Hazardous Materials* **192**: 270-276.
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R. y Kenerley, C. M. (2006).** Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 838-853.
- Djonović, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A. y Kenerley, C. M. (2007).** A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology and Biochemistry* **145**: 875-889.
- Dodds, P. N. y Rathjen, J. P. (2010).** Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539-548.
- Donoso, E. P., Bustamante, R. O., Carú, M. y Niemeyer, H. M. (2008).** Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 1412-1417.
- Druzhinina, I. S., Komoń-Zelazowska, M., Atanasova, L., Seidl, V. y Kubicek, C. P. (2010).** Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it. *PLoS One* **5**: e9191.
- Druzhinina, I. S., Komoń-Zelazowska, M., Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Belayneh, T. y Kubicek, C. P. (2008).** Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology* **154**: 3447-3459.

Bibliografía

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G. y Kubicek, C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* **47**: 55-64.

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. y Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 749-759.

El Oirdi, M. y Bouarab, K. (2007). Plant signaling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytologist* **175**: 131-139.

Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* **19**: 709-714.

Elad, Y., Chet., I., Boyle, P. y Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**: 85-88.

Elad, Y., Chet., I. y Henis, Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* **28**: 719-725.

Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. y Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **5**: 199-206.

Felts, S. J. y Toft, D. O. (2003). p23, a simple protein with complex activities. *Cell Stress Chaperones* **8**: 108-113.

Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D. R., Muday, G. K. y Lorenzo, O. (2011). Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 18506-18511.

Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., Goedegebuur, F., Houfek, T. D., England, G. J., Kelley, A. S., Meerman, H. J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H. A., Teunissen, P. J., Yao, J. y Ward, M. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 31988-31997.

Fournand, D. y Arnaud, A. (2001). Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. *Journal of Applied Microbiology* **91**: 381-393.

Fournand, D., Bigey, F. y Arnaud, A. (1998). Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus* sp. strain R312: formation of a wide range of hydroxamic acids. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2844-2852.

Gallou, A., Cranenbrouk, S. y Declerk, S. (2009). *Trichoderma harzianum* elicits defense response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology* **124**: 219-230.

Gams, W. y Mayer, W. (1998). What exactly is *Trichoderma harzianum*?. *Mycologia* **90**: 904-915.

Gams, W., Van der Aa, H. A., Van der Okaats-Niterink, A. J., Samson, R. A. y Stalper, J. A. (1987). CBS Course of micology. Centrabureau voor Schimmel cultures, Berna, Suiza.

Garnett, T, Conn, V. y Kaiser, B. N. (2009). Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant Cell & Environment* **32**: 1272-1283.

Gentile, A., Deng, Z., La Malfa, S., Distefano, G., Domina, F., Vitale, A., Polizzi, G., Lorito, M. y Tribulato E. (2007). Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase genes. *Plant Breeding* **126**: 146-151.

Gonzales-Vigil, E., Bianchetti, C. M., Phillips, G. N. Jr. y Howe, G.A. (2011). Adaptive evolution of threonine deaminase in plant defense against insect herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 5897-5902.

Gravel, V., Antoun, H. y Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 1968-1977.

Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., Monte, E. y Garcia-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3189-3198.

Gruber, S., Kubicek, C. P. y Seidl-Seiboth, V. (2011). Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7217-7226.

Gruber, S., Omann, M., Rodríguez, C. E., Radebner, T. y Zeilinger S. (2012). Generation of *Trichoderma atroviride* mutants with constitutively activated G protein signaling by using geneticin resistance as selection marker. *BMC Research Notes* **5**: 641.

Gruber, S. y Seidl-Seiboth, V. (2012). Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* **158**: 26-34.

Gu, Y. Q., Wildermuth, M. C., Chakravarthy, S., Loh, Y. T., Yang, C., He, X., Han, Y. y Martin, G. B. (2002). Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 817-831.

Hammond-Kosack, K. E. y Parker, J. E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177-193.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.

Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* **84**: 377-393.

Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **96**: 190-194.

Bibliografía

Harman, G. E. (2011). Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* **189**: 647–649.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 43-56.

Harman, G. E., Obregón, M. A., Samuels, G. J. y Lorito, M. (2010). Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. *Plant Disease* **94**: 928-939.

Hebelstrup, K. H., Shah, J. K. y Igamberdiev, A. U. (2013). The role of nitric oxide and hemoglobin in plant development and morphogenesis. *Physiologia Plantarum* **148**: 457-469.

Heinen, W. (1960). Über den enzymatischen cutin-abbau. I. Mitteilung: Nachweis eines "cutinase"-systems. *Acta Botanica Neerlandica* **9**: 167-190.

Hermosa, R., Botella, L., Keck, E., Jiménez, J. A., Montero-Barrientos, M., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Monte, E. y Nicolás, C. (2011). The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **168**: 1295–1302.

Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S. y Monte, E. (2014). Chapter 10: Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. En *Biotechnology and Biology of Trichoderma* pp. 125-137. Eds: V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina y M. Tuohy. Elsevier, The Netherlands.

Hermosa, R., Grondona, I., Ituarriaga, E., Diaz-Minguez, J., Castro, C., Monte, E. y García-Acha (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1890-1898.

Hermosa, R., Grondona, I., Llobell, A. y Monte, E. (2004a). Composition comprising fungi of genus *Trichoderma* used as biological control agents and the applications. *PCT International Patent System Appl WO 01/84935 A1*.

Hermosa, R., Grondona, I. y Monte, E. (1999). Isolation of *Trichoderma harzianum* Th2 from commercial mushroom in Spain. *Plant Disease* **83**: 591.

Hermosa, R., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, M. B., Sanz, L., Vizcaíno, J. A., Grondona, I. y Monte, E. (2004b). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research* **108**: 897-906.

Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology* **16**: 69-80.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* **158**: 17-25.

Hermosa, R., Woo, S. L., Lorito, M. y Monte, E. (2010). Proteomic approaches to understand *Trichoderma* biocontrol mechanisms and plants interactions. *Current Proteomics* **7**: 298-305.

Hill, R. D. (2012). Non-symbiotic haemoglobins-What's happening beyond nitric oxide scavenging? *AoB Plants* pls004.

Hjeljord, L. y Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En *Trichoderma and Gliocladium. Enzymes, biological control and commercial applications* (vol. 2), pp. 131-151. Eds.: C. P. Kubicek y G. E. Harman. Taylor y Francis, Londres, Reino Unido.

Hölker, U., Dohse, J. y Höfer, M. (2002). Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiology* **47**: 423-427.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* **87**: 4-10.

Howell, C. R. (2006). Understanding the mechanism employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Plant Disease* **96**: 178-180.

Hynes, M. J. y Davis, M. A. (2004). Regulation of the *amdS* gene in *Aspergillus nidulans*. En *The Mycota 3. Biochemistry and Molecular biology* 2ª edición, pp. 421-4365. Eds.: R. Branbell y G. A. Marzluf. Springer-Verlag, Berlín, Alemania.

Hynes, M. J. y Pateman, J. A. (1970). The use of amides as nitrogen sources by *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* **63**: 317-324.

Hu, G., deHart, A. K., Li, Y., Ustach, C., Handley, V., Navarre, R., Hwang, C. F., Aegerter, B. J., Williamson, V. M. y Baker, B. (2005). EDS1 in tomato is required for resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene Ve. *The Plant Journal* **42**: 376-391.

Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. y Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**: 249-264.

Istivan, T. S. y Coloe, P. G. (2006). Phospholipasa A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* **152**: 1263-1274.

Jaklitsch, W. M. (2009). European species of *Hypocrea* Part I: the green-spored species. *Studies in Mycology* **63**: 1-91.

Jaklitsch, W. M. (2011). European species of *Hypocrea*. Part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Diversity* **48**: 1-250.

Jeger, M. J., Jeffries, P., Elad, Y. y Xu, X. M. (2009). A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. *Journal of Theoretical Biology* **256**: 201-214.

Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O., Zafra-Gómez, A., Crovetto, G., Vilchez, J. L., Navalon, A., Verge, C. y de Ferrer, J. A. (2010). New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils. *Chemosphere* **80**: 248-255.

Bibliografía

Jin, Y., Bok, J. W., Guzman-de-Peña, D. y Keller, N. P. (2002). Requirement of spermidine for developmental transitions in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **46**: 801-812.

Jones, J. D. y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.

Joshi, V., Joung, J. G., Fei, Z. y Jander, G. (2010). Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* **39**: 933-947.

Kaldorf, M., Schmelzer, E. y Bothe, H. (1998). Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 439-448.

Kang, J. H., Wang, L., Giri, A. y Baldwin, I. T. (2006). Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *Plant Cell* **18**: 3303-3320.

Katagiri, F. y Tsuda, K. (2010). Understanding the plant immune system. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1531-1536.

Kay-Shoemaker, J. L., Watwood, M. E., Sojka R. E. y Lentz, R. D. (2000). Soil amidase activity in polyacrylamide-treated soils and potential activity toward common amide-containing pesticides. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 183-186.

Kelly, J. M. y Hynes, M. J. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO Journal* **4**: 475-479.

Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P. y Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 533-544.

Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Nedosekin, D. A., Dervishi, E., Biris, A. S., Shashkov, E. V., Galanzha, E. I. y Zharov, V. P. (2011). Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 1028-1033.

Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Bailey, M., Ylösmäkit, E., Siika-Aho, M. y Saloheimo, M. (2004). Expression of *Melanocapus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* **150**: 3065-3074.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. y Stapers, J. A. (2001). Ainsworth y Bisby's Dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford, Reino Unido.

Kolar, M., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. y Schawab, H. (1988). Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli* lacZ fusion gene. *Gene* **62**: 127-34.

Koller, W. y Parker, D. M. (1989). Purification and characterization of cutinase from *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **79**: 278-283.

- Kraiser, T., Gras, D. E., Gutiérrez, A. G., Gozáles, B. y Gutiérrez, R. A. (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1455-1466.
- Krouk, G., Crawford, N. M., Coruzzi, G. M. y Tsay Y. F. (2010). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 266-273.
- Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M. (1990). *Trichoderma reesei* cellulases: biodiversity, genetics, physiology and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Kubicek, C. P., Baker, S., Gamauf, C., Kenerley, C. M. y Druzhinina, I. S. (2008). Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 4.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Couplier, F., Deshpande, N., von Döhren, H., Ebole, D. J., Esquivel-Naranjo, E. U., Fekete, E., Flippin, M., Glaser, F., Gómez-Rodríguez, E. Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández-Oñate, M., Karaffa, L., Kost, I., Le Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, P. S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E. E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo-Ramos, J. A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H. H., Zhang, M., Coutinho, P. M., Kenerley, C. M., Monte, E., Baker, S. E. y Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* **12**: R40.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G. y Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma* a multigene approach. *Mycological Research* **106**: 757-767.
- Lea, P. J., Chen, Z. H., Leegood, R. C. y Walker, R. P. (2001). Does phosphoenolpyruvate carboxykinase have a role in both amino acid and carbohydrate metabolism?. *Amino Acids* **20**: 225-241.
- Lee, W. L., Bezanilla, M. y Pollard, T. D. (2000). Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *Journal of Cell Biology* **151**: 789-800.
- Lewis, J. A. y Papavizas, G. C. (1984). A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology* **74**: 1240-1244.
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K. y Muthumeenakshi, S. (1998). Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. En *Trichoderma and Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics* (vol. 1), pp. 35-56. Eds.: C. P. Kubicek y G. E. Harman. Taylor y Francis, Londres, Reino Unido.
- Lisón, P., Rodrigo, I. y Conejero, V. (2006). A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* **142**: 1329-1339.
- Liu, W. Z., Kong, D. D., Gu, X. X., Gao, H. B., Wang, J. Z., Xia, M., Gao, Q., Tian, L. L., Xu, Z. H., Bao, F., Hu, Y., Ye, N. S., Pei, Z. M. y He, Y. K. (2013). Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 1548-1553.

Bibliografía

Liu, Y. y Yang, Q. (2005). Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Research in Microbiology* **156**: 416-423.

Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402-408.

Lorito, M., Hayes, C. K., Zoina, A., Scala, F., Del Sorbo, G., Woo, S. L. y Harman, G. E. (1994). Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides. *Molecular Biotechnology* **2**: 209-217.

Lorito, M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P. y Scala, F. (1996). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**: 206-213.

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. y Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungus as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7860-7865.

Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. y Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 395-417.

Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. y Jansson, J. K. (2004). *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3073-3081.

Luo, Y., Zhang, D-D., Dong, X-W., Zhao, P-B., Chen, L-L., Song, X-Y., Wang, X-J., Chen, X-L., Shi, M. y Zhang, Y-Z. (2010). Antimicrobial peptides induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. *FEMS Microbiology Letters* **313**: 120-126.

Mach, R. L., Schindler, M. y Kubicek, C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Current Genetics* **25**: 567-570.

Madhavan, N., Roospesh, K., Chacko, S. y Pandey, A. (2005). Comparative study of amidase production by free and immobilized *Escherichia coli* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **120**: 97-108.

Malmierca, M. G., Barua, J., McCormick, S. P., Izquierdo-Bueno, I., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., Hermosa, R., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2014b). Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defense priming. *Environmental Microbiology* doi: 10.1111/1462-2920.12514. En prensa.

Malmierca, M. G., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., McCormick, S. P., Hermosa, R., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2012). Involvement of *Trichoderma* trichotecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 4856-4868.

Malmierca, M. G., McCormick, S. P., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2014a). Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. *Environmental Microbiology* doi: 10.1111/1462-2920.12560. En prensa.

- Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turra, D., Fogliano, V., Scala, F. y Lorito, M. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics* **50**: 307-321.
- Martínez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M. y Baccou, J-C. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denaturated cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **127**: 334-344.
- Martínez, A., Orbetello, M., Pardo, A., Ocampo, J. A. y Godeos, A. (2003). Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* **14**: 79-84.
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P. M., Cullen, D., Danchin, E. G., Grigoriev, I. V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C. P., Han, C. S., Ho, I., Larrondo, L. F., de Leon, A. L., Magnuson, J. K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A. A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C. L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M. A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C. R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D. S., Lucas, S. M., Rubin, E. M., Dunn-Coleman, N., Ward, M. y Brettin, T. S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology* **26**: 553-560.
- Mastouri, F., Björkman, T. y Harman, G. E. (2010). Seed treatments with *Trichoderma harzianum* alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* **100**: 1213-1221.
- Masumoto, C., Miyazawa, S., Ohkawa, H., Fukuda, T., Taniguchi, Y., Murayama, S., Kusano, M., Saito, K., Fukayama, H. y Miyao, M. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 5226-5231.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M. y Takenaka, S. (2011). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and Environments* **26**: 128-134.
- Mehrabi-Koushki, M., Rouhani, H. y Mahdikhani-Moghaddam, E. (2012). Differential display of abundantly expressed genes of *Trichoderma harzianum* during colonization of tomato-germinating seeds and roots. *Current Microbiology* **65**: 524-533.
- Mendoza-Medoza, A., Rosales-Saavedra, T., Cortés, C., Castellanos-Juárez, V., Martínez, P. y Herrera-Estrella, A. (2007). The MAP Kinase TVK1 regulates conidiation, hydrophobicity and the expression of genes encoding cell wall proteins in the fungus *Trichoderma virens*. *Microbiology* **153**: 2137-2147.
- Mikus, M., Hatvani, L., Neuhofer, T., Komon'-Zelazowska, M., Dieckmann, R., Schwecke, T., Druzhinina, I. S., von Döhren, H. y Kubicek, C. P. (2009). Differential regulation and posttranslational processing of the class II hydrophobin genes from the biocontrol fungus *Hypocrea atroviridis*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3222-3229.

Bibliografía

- Miller, J. M. y Gray, D. O. (1982).** The utilization of nitriles and amides by a *Rhodococcus* species. *Journal of General Microbiology* **128**: 1803-1809.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Press*, Nueva York, EE.UU.
- Molassiotis, A. y Fotopoulos, V. (2011).** Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree?. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 210-214.
- Monte, E. (2001).** Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* **4**: 1-4.
- Monteiro, V. N., Do Nascimento Silva, R., Steindorff, A. S., Costa, F. T., Noronha, E. F., Ricart, C. A., de Sousa, M. V., Vainstein, M. H. y Ulhoa, C. J. (2010).** New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current Microbiology* **61**: 298-305.
- Montero, M., Sanz, L., Rey, M., Llobell, A. y Monte, E. (2007).** Cloning and characterization of *bgn16.3*, coding for a beta-1,6-glucanase expressed during *Trichoderma harzianum* mycoparasitism. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 1291-1300.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Nicolás, C. y Monte E. (2010).** Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **167**: 659-665.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Nicolás, C., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S. y Monte, E. (2008).** Overexpression of a *Trichoderma HSP70* gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1506-1513.
- Moore, J. W., Loake, G. J. y Spoel, S. H. (2011).** Transcription dynamics in plant immunity. *Plant Cell* **23**: 2809-2820.
- Mora, A. y Earle, E. D. (2001).** Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 306-310.
- Morán-Diez, E., Hermosa, M. R., Ambrosio, P., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Lorito, M. y Monte, E. (2009).** The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1021-1031.
- Morán-Diez, E., Rubio, B., Domínguez, S., Hermosa, R., Monte, E. y Nicolás, C. (2012).** Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **169**: 614-620.
- Morgan, J. B. y Connolly, E. L. (2013).** Plant-soil interactions: nutrient uptake. *Nature Education Knowledge* **4**: 2.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M. y Kenerly, C. M. (2013).** *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 105-129.

- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A. y Kenerley, C. M. (2012a).** Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology* **158**: 35-45.
- Mukherjee, P. K., Latha, J., Hadar, R. y Horwitz, B. A. (2003).** TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. *Eukaryotic Cell* **2**: 446-455.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Zachow, C., Berg, G. y Zeilinger, S. (2012b).** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology* **52**: 522-529.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K. y Kale, S. P. (2007).** cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*. *Microbiology* **153**: 1734–1742.
- Muñoz, G., Nakari-Setälä, T., Agosin, E. y Penttilä, M. (1997).** Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* **32**: 225-230.
- Mur, L. A., Prats, E., Pierre, S., Hall, M. A. y Hebelstrup, K. H. (2013a).** Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science* **27**: 215.
- Mur, L. A., Hebelstrup, K. H. y Gupta, K. J. (2013b).** Striking a balance: does nitrate uptake and metabolism regulate both NO generation and scavenging?. *Frontiers in Plant Science* **30**: 288.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum* **15**: 473-497.
- Muthumeenakshi, S., Mills, P. R., Brown, A. E. y Seaby, D. A. (1994).** Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* **140**: 769-777.
- Nagata, M., Murakami, E., Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S. y Uchiumi, T. (2008).** Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1175-1183.
- Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. y Ichinose, Y. (2008).** Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1165-1174.
- Nakari-Setälä, T., Aro, N., Ilmén, M., Muñoz, G., Kalkkinen, N. y Penttilä, M. (1997).** Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei* – cloning and characterization of the *hfb2* gene. *European Journal of Biochemistry* **248**: 415–423.
- Nicaise, V., Roux, M. y Zipfel, C. (2009).** Recent Advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiology and Biochemistry* **150**: 1638–1647.
- Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P. K. y Monte, E. (2014).** *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance – status and prospects. *Plant Science*. En prensa.

Bibliografía

Nunes-Nesi, A., Ferni, A. R. y Stitt, M. (2010). Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant* **3**: 973-996.

Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M. y Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* **3**: 248.

Ohwaki, Y., Kawagishi-Kobayashi, M., Wakasa, K., Fujihara, S. y Yoneyama T. (2005). Induction of class-1 non-symbiotic hemoglobin genes by nitrate, nitrite and nitric oxide in cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology* **46**: 324-331.

O'Leary, B., Park, J. y Plaxton, W. C. (2011). The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochemical Journal* **436**: 15-34.

Osorio, S., Vallarino, J. G., Szecowka, M., Ufaz, S., Tzin, V., Angelovici, R., Galili, G. y Fernie, A. R. (2013). Alteration of the interconversion of pyruvate and malate in the plastid or cytosol of ripening tomato fruit invokes diverse consequences on sugar but similar effects on cellular organic acid, metabolism, and transitory starch accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* **161**: 628-643.

Owens, R. A., Tech, K. B., Shao, J. Y., Sano, T. y Baker, C. J. (2012). Global analysis of tomato gene expression during potato spindle tuber viroid infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 582-598.

Pace, H. C. y Brenner, C. (2001). The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology* **2**: Reviews0001.

Pandey, S. P. y Somssich, I. E. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology and Biochemistry* **150**: 1648-1655.

Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology and potential for biological control. *Annual of Review Phytopathology* **19**: 332-349.

Park, D. H., Mirabella, R., Bronstein, P. A., Preston, G. M., Haring, M. A., Lim, C. K., Collmer, A. y Schuurink, R. C. (2010). Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence. *The Plant Journal* **64**: 318-330.

Paterson, R. R. M. y Bridge, P. D. (1994). Biochemical techniques for filamentous fungi. CAB International, Wallingford, Reino Unido.

Paulitz, T. C. (1990). Biochemical and ecological aspects of competition in biological control . En *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*, pp. 713-724. Eds.: R. R. Baker y P. E. Dunn. Alan R. Liss, Nueva York, EE.UU.

Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. y Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**: 155-164.

Perazzolli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M. C., Zago, E., Zeier, J., Sonoda, M., Lamb, C. y Delledonne, M. (2004). *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785-2794.

Persoon, C. H. (1794). Dispositio methodica fungorum in Classes, Ordines, Familias et Genera. En *Neues Magazin für die Botanik*, pp. 63-128. Eds: J. J. Römer, Ziegler und Shöne, Zürich, Alemania.

Peterson, R. y Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. *Microbiology* **158**: 58-68.

Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., van der Ent, S. y van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**: 308-316.

Pollmann, S., Neu, D., Lehmann, T., Berkowitz, O., Schäfer, T. y Weiler, E. W. (2006). Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**: 1241-1253.

Pollmann, S., Neu, D. y Weiler, E. W. (2003). Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* **62**: 293-300.

Pontier, D., Godiard, L., Marco, Y. y Roby, D. (1994). *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *The Plant Journal* **5**: 507-521.

Prell, J., Boesten, B., Poole, P. y Priefer, U. B. (2002). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 γ -aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (*gabT*) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids. *Microbiology* **148**: 615-623.

Purdy, R. E. y Kolattukudy, P. E. (1973). Depolymerization of a hydroxyl fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. *pisi*: isolation and some properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **159**: 61-69.

Raeder, U. y Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* **1**: 17-20.

Reese, E. T. y Mandels, M. (1989). Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. *Annual Fermentive Process* **7**: 1-20.

Reich, P. B., Hobbie, S. E., Lee, T., Ellsworth, D. S., West, J. B., Tilman, D., Knops, J. M., Naeem, S. y Trost, J. (2006). Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. *Nature* **440**: 922-925.

Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R. y Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Review* **7**: 89-123.

Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L. y Herrera-Estrella, A. (2011). Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**: 4361-4370.

Rensink, W. A. y Buell, C. R. (2005). *Microarray* expression profiling resources for plant genomics. *Trends in Plant Science* **10**: 603-609.

Bibliografía

Rey, M., Llobell, A., Monte, E., Scala, F. y Lorito, M. (2004). Genomics of *Trichoderma*. En *Applied Mycology & Biotechnology. Fungal Genomics* (vol. 4), pp. 225-248. Eds.: D. K. Arora y G. G. Khachatourians. Elsevier Science, Amsterdam, Holanda.

Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycology Paper* **116**: 1-56.

Rodríguez-Alonso, G. y Arredondo-Peter, R. (2013). Variability of non-symbiotic and truncated hemoglobin genes from the genome of cultivated monocots. *Communicative & Integrative Biology* **6**: e27496.

Ron, M. y Avni, A. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**: 1604-1615.

Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E. U., Casas-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortés-Penagos, C. y Herrera-Estrella, A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: adissection by cDNA microarrays. *Microbiology* **152**: 3305-3317.

Rotblat, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J., M., Schuster, S. y Avni, A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *The Plant Journal* **32**: 1049-1055.

Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Hermosa, R., Gutiérrez, S., Monte, E. (2008). Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Current Genetics* **54**:301-312.

Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E. y Monte, E. (2005). Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology* **49**: 25-33.

Rubio, M. B., Hermosa, R., Reino, J. L., Collado, I. G. y Monte, E. (2009). *Thctf1* transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 17-27.

Ruzicka, D. R., Barrios-Masias, F. H., Hausmann, N. T., Jackson, L. E. y Schachtman, D. P. (2010). Tomato root transcriptome response to a nitrogen-enriched soil patch. *BMC Plant Biology* **27**: 10.1186/1471-2229-10-75.

Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., Meshi, T., Iwabuchi, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **136**: 2734-2746.

Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A. y Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology* **131**: 15-26.

Saloheimo, M. y Pakula, T. M. (2012). The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology* **158**: 46-57.

- Salvadori, M. R., Ando, R. A., Oller Do Nascimento, C. A. y Correa, B. (2014).** Bioremediation from wastewater and extracellular synthesis of copper nanoparticles by the fungus *Trichoderma koningiopsis*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **49**: 1286-1295.
- Sambrook, J. y Russel, D. W. (2001).** Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
- Samolski, I., de Luis, A., Vizcaíno, J. A., Monte, E. y Suárez, M. B. (2009).** Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plant, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide *microarray*. *BMC Microbiology* **9**: 217.
- Samolski, I., Rincón, A. M., Pinzón, L. M., Viterbo, A. y Monte, E. (2012).** The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* **158**: 129-138.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respinis, S. y Petrini, O. (2010).** *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* **102**: 944-966.
- Sánchez-Arrenguín, A., Pérez-Martínez, A. S. y Herrera-Estrella, A. (2012).** Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* reveals independent roles for transcription factors BLR-1 and BLR-2 in light and darkness. *Eukaryotic Cell* **11**: 30-41.
- Scherm, B., Schmoll, M., Balmas, V., Kubicek, C. P. y Migheli, Q. (2009).** Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Current Genetics* **55**: 81-91.
- Schillmiller, A. L., Schauvinhold, I., Larson, M., Xu, R., Charbonneau, A. L., Schmidt, A., Wilkerson, C., Last, R. L. y Pichersky, E. (2009).** Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 10865-10870.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E. y Kubicek, C. P. (1994).** Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4364-4370.
- Schmoll, M., Zeilinger, S., Mach, R. L. y Kubicek, C. P. (2004).** Cloning of genes expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 877-887.
- Schulze, A. y Downward, J. (2001).** Navigating gene expression using *microarrays*- a technology review. *Nature Cell Biology* **3**: 190-195.
- Schuster, A. y Schmoll, M. (2010).** Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 787-799.
- Schwarzenbacher, R. E., Luna, E. y Ton, J. (2014).** The discovery of the BABA receptor: scientific implications and application potential. *Frontiers in Plant Science* **25**: 304.

Bibliografía

- Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E. y Trillas, I. (2007).** Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* **7**: 3943-3952.
- Segarra, G., van der Ent, S., Trillas, I. y Pieterse, C. M. J. (2009).** MIB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology* **11**: 90-96.
- Seidl, V., Huemer B, Seiboth, B. y Kubicek, C. P. (2005).** A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal* **272**: 5923-5939.
- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G. y Kubicek, C. P. (2006).** Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS Journal* **273**: 4346-4359.
- Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C. P. y Schmoll, M. (2009).** Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 13909-13914.
- Seidl-Seiboth, V., Gruber, S., Sezerman, U., Schwecke, T., Albayrak, A., Neuhof, T., von Döhren, H., Baker, S. E. y Kubicek, C. P. (2011).** Novel hydrophobins from *Trichoderma* define a new hydrophobin subclass: protein properties, evolution, regulation and processing. *Journal of Molecular Evolution* **72**: 339-351.
- Serrano, M. y Guzmán, P. (2004).** Isolation and gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants with constitutive expression of *ATL2*, an early elicitor-response RING-H2 zinc-finger gene. *Genetics* **167**: 919-929.
- Sharma, R. D., Goswami, N., Lynn, A. M., Rajnee, Sharma, P. K. y Jawaid, S. (2009).** A modeled structure for amidase-03 from *Bacillus anthracis*. *Bioinformation* **4**: 242-244.
- Sherameti, I, Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A. y Oelmüller, R. (2005).** The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 26241-26247.
- Shi, M., Chen, L., Wang, X. W., Zhang, T., Zhao, P. B., Song, X. Y., Sun, C. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C. y Zhang, Y. Z. (2012).** Antimicrobial peptaiboles from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology* **158**: 166-175.
- Shi, X., Gupta, S., Lindquist, I. E., Cameron, C. T., Mudge, J., Rashotte, A. M. (2013).** Transcriptome analysis of cytokinin response in tomato leaves. *PLoS One* **8**: e55090.
- Shoresh, M. y Harman, G. E. (2008).** The molecular basis of maize responses to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation: a proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry* **147**: 2147-2163.
- Shoresh, M., Harman, G. E. y Mastouri, F. (2010).** Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 21-43.

- Shoresh, M., Yedidia, I. y Chet, I. (2005).** Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* **95**: 76-84.
- Sivasithamparam, K., y Ghisalberti, E. L. (1998).** Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics* (vol.1), pp.139-191. Eds.: C. P. Kubicek y G. E. Harman. Taylor and Francis, Londres, Reino Unido.
- Solanki, M. K., Singh, N., Singh, R. K., Singh, P., Srivastava, A. K., Kumar, S., Kashyap, P. L. y Arora, D. K. (2011).** Plant defense activation and management of tomato root rot by a chitin-fortified *Trichoderma/Hypocrea* formulation. *Phytoparasitica* **39**: 471-481.
- Solomon, P. S. y Oliver, R. P. (2002).** Evidence that c-aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta* **214**: 414-420.
- Sonneveld, C. y Voogt, W. (2009).** Plant nutrition of greenhouse crops. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. y Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Reviews* **31**: 425-448.
- Spassieva, S. D., Markham, J. E. y Hille, J. (2002).** The plant disease resistance gene Asc-1 prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *The Plant Journal* **32**: 561-572.
- Stasz, T. E., Nixon, K., Harman, G. E., Weeden, N. F. y Kuter, G. A. (1989).** Evaluation of phonetic species and phylogenetic relationship in the genus *Trichoderma* by cladistics analysis of isozymes polymorphism. *Mycologia* **81**: 391-403.
- Stergiopoulos, I. y de Wit, P. J. (2009).** Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 233-263.
- Stone, J. M. y Walker, J. C. (1995).** Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology and Biochemistry* **108**: 451-457.
- Stoppacher, N., Zeilinger, S., Omann, M., Lassahn, P. G., Roitinger, A., Krska, R. y Schuhmacher, R. (2008).** Characterisation of the peptaibolome of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**: 1889-1898.
- Strieker, M., Tanovic, A. y Marahiel, M. A. (2010).** Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* **20**: 234-240.
- Studholme, D. J., Harris, B., Le Cocq, K., Winsbury, R., Perera, V., Ryder, L., Ward, J. L., Beale, M. H., Thornton, C. R. y Grant, M. (2013).** Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture-insights from genomics. *Frontiers in Plant Science* **4**: 258.
- Suárez, M. B., Sanz, L., Chamorro, M. I., Rey, M., González, F. J., Llobell, A. y Monte, E. (2005).** Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 924-934.

Bibliografía

Suárez, M. B., Vizcaíno, J. A., Llobell, A. y Monte E. (2007). Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the *TrichoEST* functional genomics approach. *Current Genetics* **51**: 331-342.

Takemoto, D., Yoshioka, H., Doke, N. y Kawakita, K. (2003). Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. *Physiologia Plantarum* **118**: 545-553.

Tang, J., Liu, L., Huang, X., Li, Y., Chen, Y. y Chen, J. (2010). Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* mycelia stressed by organophosphate pesticide dichlorvos. *Canadian Journal of Microbiology* **56**: 121-127.

Thomma, B. P., Nürnberger, T. y Joosten, M. H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* **23**: 4-15.

Thomma, B. P., Cammue, B. P. y Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta* **216**: 193-202.

Tijerino, A., Cardoza, R. E., Moraga, J., Malmierca, M. G., Vicente, F., Aleu, J., Collado, I. G., Gutierrez, S., Monte, E. y Hermosa, R. (2011a). Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 285-296.

Tijerino, A., Hermosa, R., Cardoza, R. E., Moraga, J., Malmierca, M. G., Aleu, J., Collado, I. G., Monte, E. y Gutierrez, S. (2011b). Overexpression of the *Trichoderma brevicompactum* *tri5* gene: effect on the expression of the trichodermin biosynthetic genes and on tomato seedlings. *Toxins* **3**: 1220-1232.

Trevaskis, B., Watts, R. A., Andersson, C. R., Llewellyn, D. J., Hargrove, M. S., Olson, J. S., Dennis, E. S. y Peacock, W. J. (1997). Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **28**: 12230-12234.

Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P. S., Dwivedi, S., Bais, R. T. y Tripathi, R. D. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy* **15**: 541-550.

Truman, W. M., Bennett, M. H., Turnbull, C. G. N. y Grant, M. R. (2010). *Arabidopsis* auxins mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant Physiology and Biochemistry* **152**: 1562-1573.

Tsay, Y. F. (2014). How to switch affinity. *Plant Science* **507**: 44-45.

Tucci, M., Ruocco, M., de Masi, L., de Palma, M. y Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology* **12**: 341-354.

Tusher, V. G., Tibshirani, R. y Chu, G. (2001). Significance analysis of *microarrays* applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 5116-5121.

- Upadhyay, P., Rai, A., Kumar, R., Singh, M. y Sinha, B. (2014).** Differential expression of pathogenesis related protein genes in tomato during inoculation with *A. solani*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* **5**: 217.
- van Loon, L. C. y Bakker, P. A. H. M. (2005).** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. En *PGPR: "Biocontrol and biofertilization"*, pp. 39-60. Eds: Z. A. Siddiqui, Springer Science, Dordrecht, The Netherlands.
- van Niel, E. W., Palmfeldt, J., Martin, R., Paese, M. y Hahn-Hägerdal, B. (2004).** Reappraisal of the regulation of lactococcal L lactate dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1843–1846.
- van Zeijl, C. M. J., van den Kamp, E. H. M., Punt, P. J., Selten, G. C. M., Hauer, B., van Gorcom, R. F. M. y van den Hondel, C. A. M. J. J. (1998).** An improved colony-PCR method for filamentous fungi for amplification of PCR-fragments of several kilobases. *Journal of Biotechnology* **59**: 221-224.
- Vargas, W. A., Crutcher, F. K. y Kenerley, C. M. (2011).** Functional characterization of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytologist* **189**: 777-789.
- Vargas, W. A., Mandawe, J. C. y Kenerley, C. M. (2009).** Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **151**: 792-808.
- Vargas, W. A., Mukherjee, P. K., Laughlin, D., Wiest, A., Morán-Diez, M. E. y Kenerley, C. M. (2014).** Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiology*. doi: 10.1099. En prensa.
- Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., Lopez-Bucio, J. y Herrera-Estrella, A. (2011).** Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 1459-1471.
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. y Valéro, J. R. (2007).** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* **37**: 1-20.
- Vidal, E. A. y Gutiérrez, R. A. (2008).** A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 521-529.
- Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R., Skelton, B. W. y Ghisalberti, E. L. (2009).** Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Nature Products* **72**: 2032-2035.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Lorito, M. y Sivasithamparam, K. (2006).** Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* **43**: 143-148.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S. L. y Lorito, M. (2013).** Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters* **347**: 123-129.

Bibliografía

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S. L. y Lorito, M. (2008a). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**: 80-86.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. y Lorito, M. (2008b). *Trichoderma*-plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 1-10.
- Viterbo, A. y Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. En *Cellular and molecular biology of filamentous fungi* (vol. 42), pp. 676–693. Eds.: K. A. Borkovich y D. J. Ebbole. American Society for Microbiology. Washington, EE.UU.
- Viterbo A. y Chet, I. (2006). *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology* **7**: 249-258.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. y Chet, I. (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiology Letters* **305**: 42-48.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. y Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 549-556.
- Viterbo, A., Wiest, A., Brotman, Y., Chet, I. y Kenerley, C. (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defense responses. *Molecular Plant Pathology* **8**: 737-764.
- Vizcaíno, J. A., Cardoza, R. E., Dubost., L., Bodo, B., Gutiérrez, S. y Monte, E. (2006a). Detection of peptaibols and partial cloning of putative peptaibol synthetase gene from *T. harzianum* CECT 2413. *Folia Microbiology* **51**: 114-120.
- Vizcaíno, J. A., González, F. J., Suárez, M. B., Redondo, J., Heinrich, J., Delgado-Jarana, J., Hermosa, R., Gutiérrez, S., Monte, E., Llobell, A. y Rey, M. (2006b). Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics* **7**: 193.
- Vizcaíno, J. A., Redondo, J., Suárez, M. B., Cardoza, R. E., Hermosa, R., González, F. J., Rey, M. y Monte, E. (2007). Generation, annotation and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**: 853-862.
- Vrany, J., Rasochova, M., Filker, A. y Dovies, K. (1990). Inoculation of potatoes with microorganisms under field conditions. Effect on plant growth, yields and physiological properties of tubers in potato and sugar-beet regions. *Folia Microbiology* **35**: 326-335.
- Walker, K., Ketchum, R. E., Hezari, M., Gatfield, D., Goleniowski, M., Barthol, A. y Croteau, R. (1999). Partial purification and characterization of acetyl coenzyme A: taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol O-acetyl transferase that catalyzes the first acylation step of taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **364**: 273-279.
- Wang, Y. H., Kochian, L. V., Doyle, J. J. y Garvin, D. F. (2003). Two tomato non-symbiotic haemoglobin genes are differentially expressed in response to diverse changes in mineral nutrition status. *Plant Cell & Environment* **26**: 673–680.

- Wei, M., Sykorova, Z., Garnica, S., Riess, K., Martos, F., Krause, C., Oberwinkler, F., Bauer, R. y Redecker, D. (2011). *Sebacinales* everywhere: previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLoS One* **6**: e16793.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* **22**: 837-845.
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. y Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* **96**: 181-185.
- Xie, B. B., Qin, Q. L., Shi, M., Chen, L. L., Shu, Y. L., Luo, Y., Wang, X. W., Rong, J. C., Gong, Z. T., Li, D., Sun, C. Y., Liu, G. M., Dong, X. W., Pang, X. H., Huang, F., Liu, W., Chen, X. L., Zhou, B. C., Zhang, Y. Z. y Song, X. Y. (2014). Comparative genomics provide insights into evolution of *Trichoderma* nutrition style. *Genome Biology and Evolution* **6**: 379-390.
- Yang, H. H., Yang, S. L., Peng, K. C., Lo, C. Y. y Liu, S. Y. (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **113**: 924-932.
- Yedidia, I., Benhamou, N. y Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1061-1070.
- Zamir, D. y Chet, I. (1985). Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Botany* **31**: 578-580.
- Zeigler, R. S. y Mohanty, S. (2010). Support for international agricultural research: current status and future challenges. *New Biotechnology* **27**: 565-572.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M. y Kubicek, C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology* **26**: 131-140.
- Zhang, H. y Forde, B. G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* **51**: 51-59.
- Zhang, M., Liu, J., Li, K. y Yu, D. (2013). Identification and characterization of a novel monoterpene synthase from soybean restricted to neryl diphosphate precursor. *PLoS One* **4**: e75972. doi: 10.1371.
- Zheng, Z. L. (2009). Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 584-91.