

# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

---



**Estudio de la ruta de shikimato en *Trichoderma parareesei*, su papel en el antagonismo del hongo y en las relaciones que establece con la planta**

**Esclaudys Pérez González**

**2014**





# **UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

## **Estudio de la ruta de shikimato en *Trichoderma parareesei*, su papel en el antagonismo del hongo y en las relaciones que establece con la planta**

Memoria presentada por Esclaudys Pérez González para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Salamanca, 9 de octubre del 2014



**M. Rosa Hermosa Prieto**, Profesor Doctor Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada **“Estudio de la ruta de shikimato en *Trichoderma parareesei*, su papel en el antagonismo del hongo y en las relaciones que establece con la planta”** presentada por Esclaudys Pérez González para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos este certificado en Salamanca a los 9 días del mes de octubre de 2014.

Fdo.: M. Rosa Hermosa Prieto



**Carlos Nicolás Rodríguez**, Coordinador del Programa de Doctorado en Agrobiotecnología de la Universidad de Salamanca,

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada **“Estudio de la ruta de shikimato en *Trichoderma parareesei*, su papel en el antagonismo del hongo y en las relaciones que establece con la planta”** presentada por Esclaudys Pérez González para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M. Rosa Hermosa Prieto, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos este certificado en Salamanca a los 9 días del mes de octubre de 2014.

Fdo.: Carlos Nicolás Rodríguez





**Luis Román Fernández Lago**, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada **“Estudio de la ruta de sikimato en *Trichoderma parareesei*, su papel en el antagonismo del hongo y en las relaciones que establece con la planta”** presentada por Esclaudys Pérez González para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M. Rosa Hermosa Prieto, 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 los 9 días del mes de octubre del 2014.

Fdo.: Luis Román Fernández Lago



## **AGRADECIMIENTOS**

En estas líneas quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a cada una de las personas que de manera directa e indirecta han contribuido a la culminación de este proyecto.

De manera especial, quiero agradecer enormemente a Rosa, mi directora de tesis y profesores de siempre, por su incansable entrega, por todas las horas extras y por todo el conocimiento transmitido.

Gracias Enrique, por aceptarme como parte del grupo del L2, por las acertadas aclaraciones en momentos de dudas, por las palabras de ánimo, por tus entretenidas charlas que entre ciencia y deporte “fútbol/baseball” puedes congeniar muy bien.

Gracias a los compañeros del laboratorio L2, especialmente a Irene por tu franca amistad; Ana por tus agradables ocurrencias; Belén y Carlo por la disposición en los momentos que solicité ayuda; Sara, Raquel, Andrés, Jorge, Mota y Wagner, gracias a todos por acogerme como uno más del grupo y hacer que estos tres años fueran más llevaderos.

Gracia a Santiago Gutiérrez y Rosa Elena por su hospitalidad y el apoyo brindado para la obtención de los transformantes para la tesis.

Agradecer también a Isabel Chamorro por tantas ayudas prestadas, a Vega, Marta y los chicos de las tertulias en la sala de becario como: Raúl, Vinicio, Daniela, Ángel, Ángela, Alex.....gracias a todos

Finalmente, y no menos importante, agradecer a Libby mi esposa, por el papel de madre y padre que ha desempeñado en estos años, también a mis pequeños gigantes: Diana, Diego y David.....espero compensar el tiempo de mi ausencia.



## Siglas y abreviaturas

<b>ABA</b>	ácido abscísico
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ANOVA</b>	análisis de la varianza
<b>AREB2</b>	<i>abscisic acid response element binding 2</i>
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	ribonucleasa A
<b>atm</b>	atmósferas
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
<b>c.s.p.</b>	cantidad suficiente para
<b>CAZy</b>	<i>Carbohydrate Active Enzymes</i>
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CIA</b>	cloroformo-alcohol isoamílico
<b>CMC</b>	carboximetil celulosa
<b>CTAB</b>	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
<b>D.O.</b>	densidad óptica
<b>DAMP</b>	<i>damage associate molecular patterns</i>
<b>dCTPs</b>	desoxicitosina trifosfato
<b>DEPC</b>	dietil pirocarbonato
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DREB3</b>	<i>dehydration response element binding</i>
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EC</b>	<i>Enzyme Commission number</i>
<b>EDTA</b>	ácido etilendiamino-tetracético
<b>EE.UU.</b>	Estados Unidos
<b>EIN2</b>	<i>ethylene insensitive 2</i>
<b>ESTs</b>	<i>expressed sequence tags</i>
<b>ET</b>	etileno
<b>ETI</b>	<i>effector triggered immunity</i>
<b>g</b>	aceleración de la gravedad terrestre
<b>g</b>	gramos
<b>GAs</b>	giberelinas
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alta resolución
<b>HPLC-MS</b>	cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masa
<b>HR</b>	respuesta hipersensible
<b>IAA</b>	ácido indolacético
<b>IMI</b>	<i>International Mycological Institute</i>
<b>IPTG</b>	isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>ISR</b>	respuesta sistémica inducida
<b>ITS</b>	<i>internal transcribed region</i>

<b>JA</b>	ácido jasmónico
<b>kb</b>	kilobase
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>L</b>	litro
<b>LOXI</b>	<i>lipoxygenase 1</i>
<b>M</b>	molaridad
<b>MAMP</b>	<i>microbe associate molecular patterns</i>
<b>mg</b>	miligramo
<b>mL</b>	mililitro
<b>MTI</b>	<i>MAMP-triggered immunity</i>
<b>NAG</b>	N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina
<b>NCBI</b>	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
<b>ORF</b>	fase de lectura abierta
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>PAMP</b>	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	polietilenglicol
<b>Phe</b>	fenilalanina
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>PRI</b>	<i>pathogenesis related protein 1</i>
<b>PRR</b>	<i>pattern recognition receptor</i>
<b>PTI</b>	<i>PAMP-triggered immunity</i>
<b>RAPD</b>	<i>random amplification of polymorphic DNA</i>
<b>RFLP</b>	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
<b>RISC</b>	<i>RNA-inducing silencing complex</i>
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SA</b>	ácido salicílico
<b>SAR</b>	respuesta sistémica adquirida
<b>SCAR</b>	<i>sequence characterized amplified region</i>
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>siRNA</b>	ácido ribucleico de interferencia
<b>SOS1</b>	<i>Salt overly sensitive 1</i>
<b>spp.</b>	especies
<b>Tris</b>	tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>Trp</b>	triptófano
<b>U</b>	unidad de actividad enzimática
<b>UFC</b>	unidad formadora de colonia
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>V</b>	voltio
<b>v/v</b>	volumen/volumen
<b>X</b>	número de veces de concentración
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido

## **Aminoácidos**

<b>A</b> (Ala)	Alanina
<b>C</b> (Cys)	Cisteína
<b>D</b> (Asp)	Ácido aspártico
<b>E</b> (Glu)	Ácido glutámico
<b>F</b> (Phe)	Fenilalanina
<b>G</b> (Gly)	Glicina
<b>H</b> (His)	Histidina
<b>I</b> (Ile)	Isoleucina
<b>K</b> (Lys)	Lisina
<b>L</b> (Leu)	Leucina
<b>M</b> (Met)	Metionina
<b>N</b> (Asn)	Asparagina
<b>P</b> (Pro)	Prolina
<b>Q</b> (Gln)	Glutamina
<b>R</b> (Arg)	Arginina
<b>S</b> (Ser)	Serina
<b>T</b> (Thr)	Treonina
<b>V</b> (Val)	Valina
<b>W</b> (Trp)	Triptófano
<b>Y</b> (Tyr)	Tirosina

## **Bases nitrogenadas**

<b>A</b>	Adenina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina
<b>T</b>	Timina
<b>U</b>	Uracilo
<b>I</b>	Inosina
<b>R</b>	G/A
<b>Y</b>	C/T
<b>W</b>	A/T
<b>S</b>	G/C
<b>K</b>	G/T
<b>M</b>	A/C
<b>B</b>	C/G/T, pero no A
<b>D</b>	A/G/T, pero no C
<b>H</b>	C/A/T, pero no G
<b>V</b>	C/G/A, pero no T
<b>N</b>	A/C/G/T





<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>1. BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Trichoderma</i></b>	3
1.1. Morfología	3
1.2. Sistemática	3
1.3. Ecología	4
<b>2. <i>TRICHODERMA PARAREESEI</i></b>	5
<b>3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE <i>Trichoderma</i> COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO</b>	7
<b>3.1. Micoparasitismo</b>	7
<b>3.2. Antibiosis</b>	10
3.2.1. <u>Pironas</u>	11
3.2.2. <u>Cerinolactona</u>	12
3.2.3. <u>Policétidos</u>	12
3.2.4. <u>Terpenos</u>	12
3.2.5. <u>Isocianos</u>	13
3.2.6. <u>Viridina</u>	14
3.2.7. <u>Peptaiboles</u>	14
3.2.8. <u>Compuestos de tipo dicetopiperazina</u>	14
3.2.9. <u>Harzianolida y ácido harziánico</u>	15
<b>3.3. Competencia con el patógeno</b>	15
<b>3.4. Promoción del crecimiento de las plantas</b>	15
<b>3.5. Incremento de las defensas de la planta frente a estreses bióticos</b>	16
3.5.1. <u>Defensas de las plantas</u>	16
3.5.2. <u>Redes de señalización en las defensas de la planta</u>	18
3.5.3. <u><i>Trichoderma</i> y las defensas de la planta</u>	21
<b>3.6. Incremento de la tolerancia de la planta frente a estreses abióticos</b>	24
<b>4. APLICACIONES DEL GÉNERO <i>Trichoderma</i></b>	24
<b>5. BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS</b>	26
<b>6. “ÓMICAS” EN <i>TRICHODERMA</i></b>	29
<b>6.1. Estrategias para el estudio de la función génica</b>	31
<b>OBJETIVOS</b>	34
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	39
<b>1. ORGANISMOS UTILIZADOS</b>	41
<b>1.1 Bacterias</b>	41

---

1.2. Cepas de <i>Trichoderma</i> .....	41
1.3. Hongos y oomicetos fitopatógenos .....	41
1.4. Material vegetal .....	42
<b>2. VECTORES UTILIZADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>3. MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>43</b>
3.1. Medios de cultivo para bacterias .....	43
3.2. Medios de cultivo para hongos .....	44
3.3. Medios de cultivo para planta.....	46
<b>4. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS .....</b>	<b>46</b>
4.1. Cultivo y mantenimiento de bacterias .....	46
4.2. Cultivo de hongos .....	47
4.2.1. <u>Obtención y recogida de esporas</u> .....	47
4.2.2. <u>Cultivo para la obtención de germínulas de <i>T. parareesei</i></u> .....	47
4.2.3. <u>Cultivo para la obtención de sobrenadante de <i>T. parareesei</i></u> .....	47
4.2.4. <u>Cultivos para la obtención de proteínas intracelulares</u> .....	47
4.2.5. <u>Cultivo para la extracción de ADN de <i>T. parareesei</i></u> .....	48
4.2.6. <u>Cultivo para el análisis de la expresión génica de <i>T. parareesei</i></u> .....	48
4.2.7. <u>Cultivo para la obtención de pared celular de <i>R. solani</i></u> .....	48
4.3. Mantenimiento de hongos .....	49
4.4. Crecimiento de tomate.....	49
<b>5. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO .....</b>	<b>49</b>
<b>6. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS .....</b>	<b>51</b>
6.1. Transformación de <i>E. coli</i> .....	51
6.1.1. <u>Preparación de células competentes</u> .....	51
6.1.2. <u>Transformación de células DH5<math>\alpha</math></u> .....	51
6.2. Transformación de <i>T. parareesei</i> .....	52
6.2.1. <u>Preparación de protoplastos</u> .....	52
6.2.2. <u>Transformación del hongo</u> .....	53
6.2.2.1. Selección de los transformantes .....	53
<b>7. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....</b>	<b>53</b>
7.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña y mediana escala. ....	53
7.1.1. <u>Extracción rápida de ADN plasmídico de bacterias transformadas...</u>	54
7.2. Extracción de ADN genómico de <i>Trichoderma</i> .....	54
7.2.1. <u>Extracción a pequeña escala</u> .....	54
7.2.2. <u>Extracción rápida</u> .....	55
7.2.3. <u>Extracción a mayor escala</u> .....	55

7.3. Extracción de ADN de interacciones tomate- <i>Trichoderma</i> .....	56
7.4. Extracción de ARN .....	57
<b>8. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....	58
<b>8.1. Cuantificación de ácidos nucleicos</b> .....	58
<b>8.2. Manipulación enzimática de ADN</b> .....	58
8.2.1. <u>Digestión con enzimas de restricción</u> .....	58
8.2.2. <u>Fenolización de ADN plasmídico</u> .....	58
8.2.3. <u>Ligación de moléculas de ADN</u> .....	59
<b>8.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	59
8.3.1. <u>Reacción de PCR clásica</u> .....	59
8.3.1.1. <u>Marcaje no radiactivo de ADN</u> .....	60
8.3.2. <u>RT-PCR</u> .....	60
8.3.3. <u>PCR a tiempo real (Real-time PCR)</u> .....	60
8.3.4. <u>Oligonucleótidos empleados</u> .....	61
<b>8.4. Electroforesis de ácidos nucleicos</b> .....	62
8.4.1. <u>Electroforesis de ADN</u> .....	62
8.4.1.1. <u>Purificación de ADN a partir de geles de agarosa</u> .....	62
8.4.2. <u>Electroforesis de ARN</u> .....	62
<b>8.5. Secuenciación de ADN</b> .....	63
<b>8.6. Hibridación del ADN</b> .....	63
8.6.1. <u>Transferencia de ADN a membrana</u> .....	63
8.6.2. <u>Prehibridación, hibridación y lavados</u> .....	64
8.6.3. <u>Detección</u> .....	64
8.6.4. <u>Reutilización de membrana</u> .....	65
<b>9. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	65
<b>9.1. Obtención y cuantificación de proteínas intracelulares de <i>T. parareesei</i></b> .....	65
<b>9.2. Determinación de actividades enzimáticas</b> .....	66
9.2.1. <u>Actividad corismato mutasa</u> .....	66
9.2.2. <u>Actividad quitinasa</u> .....	66
9.2.3. <u>Actividad proteasa</u> .....	67
9.2.4. <u>Actividad celulasa</u> .....	67
<b>10. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS</b> .....	68
<b>10.1. Cuantificación de ácido salicílico (SA) mediante método colorimétrico</b> .....	68
<b>10.2. Cuantificación de metabolitos mediante HPLC-MS</b> .....	68
<b>11. ENSAYOS DE CRECIMIENTO</b> .....	69
<b>11.1. Ensayos con <i>T. parareesei</i></b> .....	69
11.1.1. <u>Cantidad de inóculo y presencia de Phe, tirosol y Trp</u> .....	69

11.1.2. <u>Distintos medios de cultivo</u> .....	69
11.1.3. <u>Distintas temperaturas de incubación</u> .....	70
11.1.4. <u>Con exudados de plantas</u> .....	70
<b>11.2. Ensayos con tomate</b> .....	70
<b>12. ENSAYOS ANTIFÚNGICOS</b> .....	71
12.1. <b>Cultivos duales</b> .....	71
12.2. <b>Ensayos de membranas</b> .....	71
<b>13. ENSAYOS <i>T. parareesei</i>-TOMATE IN VITRO</b> .....	71
13.1. <b>Efectos sobre el desarrollo de plantas de tomate</b> .....	71
13.1.1. <u>Efecto del hongo</u> .....	71
13.1.2. <u>Efecto del sobrenadante</u> .....	72
13.2. <b>Colonización de raíces de tomate</b> .....	72
<b>14. ENSAYOS <i>T. parareesei</i>-TOMATE IN VIVO</b> .....	72
14.1. <b>Ensayos bajo estrés salino</b> .....	73
14.2. <b>Ensayos de infección con <i>B. cinerea</i></b> .....	73
14.3. <b>Ensayos de infección con Pst</b> .....	73
<b>15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	74
<b>16. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y SOFTWARE</b>	
UTILIZADOS.....	74
16.1. <b>Búsqueda de secuencias similares en bases de datos</b> .....	74
16.1.1. <u>FASTA</u> .....	74
16.1.2. <u>BLAST</u> .....	75
16.1.3. <u>Alineamiento de secuencias</u> .....	75
16.1.4. <u>Otras manipulaciones de secuencias</u> .....	75
16.2. <b>Análisis de estructuras de proteínas</b> .....	76
16.3. <b>Análisis de los dominios de unión a factores de transcripción</b> .....	76
16.4. <b>Otras herramientas de predicción</b> .....	76
16.5. <b>Herramientas de edición</b> .....	77
<b>17. CASAS COMERCIALES</b> .....	77
<b>RESULTADOS</b>	79
<b>1. ESTUDIOS PRELIMINARES</b> .....	81
<b>2. EL GEN <i>Tpcmu1</i> DE <i>T. parareesei</i></b> .....	82
2.1. <b>Aislamiento del gen <i>Tpcmu1</i></b> .....	82
2.2. <b>Análisis <i>in silico</i> de secuencias nucleotídicas y de la secuencia aminoacídica de TPCMU1</b> .....	84

2.2.1. <u>Estudio de la región promotora del gen <i>cmu1</i> de <i>T. reseei</i></u> .....	
2.2.2. <u>Análisis de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína TPCMU1</u> .....	86
<b>2.3. Estudio de expresión de <i>Tpcm1</i> en <i>T. parareesei</i> T6</b> .....	90
<b>3. OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>T. parareesei</i> SILENCIADAS EN EL GEN <i>Tpcm1</i></b> .....	91
<b>3.1. Comprobación y selección de transformantes</b> .....	91
<b>3.2. Análisis de expresión de <i>Tpcm1</i> en los transformantes</b> .....	93
<b>3.3. Actividad corismato mutasa de los transformantes</b> .....	94
<b>4. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>Tpcm1</i> EN EL CRECIMIENTO DE <i>T. parareesei</i> T6</b> .....	95
<b>4.1. Crecimiento en diferentes medios de cultivo</b> .....	95
<b>4.2. Crecimiento a diferentes temperaturas</b> .....	98
<b>4.3. Crecimiento con exudados de planta</b> .....	99
<b>5. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>Tpcm1</i> EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN <i>T. parareesei</i></b> .....	100
<b>5.1. Producción de SA en las diferentes cepas de <i>T. parareesei</i></b> .....	101
<b>5.2. Producción de IAA y tirosol en las diferentes cepas de <i>T. parareesei</i></b> ...	101
<b>6. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>Tpcm1</i> EN LAS PROPIEDADES ANTAGONISTAS DE <i>T. parareesei</i></b> .....	102
<b>6.1. Actividad antagonista en cultivo dual</b> .....	102
<b>6.2. Actividad antagonista en cultivos sobre membrana</b> .....	103
<b>6.3. Actividades hidrolíticas</b> .....	105
<b>7. PAPEL DEL GEN <i>Tpcm1</i> DE <i>T. parareesei</i> EN LA COLONIZACIÓN DE RAÍCES DE TOMATE POR EL HONGO</b> .....	106
<b>8. RESPUESTAS DE PLANTAS DE TOMATE AL SILENCIAMIENTO DE <i>Tpcm1</i> EN <i>T. parareesei</i> EN INTERACCIONES HONGO-PLANTA</b> .....	107
<b>8.1. Efecto de <i>T. parareesei</i> y del silenciamiento de <i>Tpcm1</i> en el desarrollo de plántulas de tomate en ensayos <i>in vitro</i></b> .....	107
<b>8.2. Efecto del sobrenadante fúngico en la germinación de semillas y en el desarrollo de plántulas de tomate en ensayos <i>in vitro</i></b> .....	108
<b>8.3. Efecto de <i>T. parareesei</i> y del silenciamiento de <i>Tpcm1</i> en plantas de tomate en ensayos <i>in vivo</i></b> .....	110
8.3.1. <u>Desarrollo y respuesta a sal</u> .....	110
8.3.2. <u>Defensa frente a patógenos</u> .....	112
8.3.3. <u>Cambios de expresión en genes marcadores de defensa en tomate</u> ...	116

<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	119
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	141
<b><u>APÉNDICE</u></b>	146
<b>1. SECUENCIA DEL GEN <i>Tpcmu1</i> Y DE LA PROTEINA TPCMU1</b>	148
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	150

## **INTRODUCCIÓN**

---





## 1. BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Trichoderma*

### 1.1. Morfología

El género *Trichoderma* agrupa hongos filamentosos anamórficos (mitóticos) pertenecientes a la División Deuteromicota y, a su vez, a la clase de los Hifomicetos (Gams y col., 1987). Se reproducen de forma asexual alternando la formación de micelio y esporas (conidios), éstas últimas formadas a partir de células desnudas (Webster, 1980). En algunos aislamientos se ha descrito el estado perfecto, sexual o teleomórfico (meiótico) dentro del género *Hypocrea*, así se han identificado *Hypocrea virens* como el estado teleomorfo de *Trichoderma virens* (Chaverri y col., 2001), *Hypocrea atroviridis* el de *Trichoderma atroviride* (Dodd y col., 2003) o *Hypocrea lixii* el de *Trichoderma harzianum* (Chaverri y col., 2003). Los primeros estudios moleculares que indicaron que las especies del género *Trichoderma* son derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar su ciclo sexual fueron los de Kuhls y col. (1996).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* emiten grandes cantidades de conidios, generalmente verdes, 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 y con un solo núcleo. El número de cromosomas por núcleo varía de 3 a 7 (Goldman y col., 1998) y varía también el tamaño del genoma, por ejemplo 34,1 Mpb para *Trichoderma reesei* (Martinez y col., 2008), 36,1 Mpb para *T. atroviride* y 38,8 Mpb para *T. virens* (Kubicek y col., 2011).

### 1.2. Sistemática

El género *Trichoderma* se describió hace ya 220 años (Persoon, 1794). Sin embargo, debido a la similitud de sus especies, la taxonomía del género basada en criterios morfológicos fue ardua hasta la llegada de las técnicas moleculares. Entre las primeras clasificaciones, sustentadas en criterios morfológicos, se encuentran las de Rifai (1969) y Bisset (1991). Rifai estableció nueve “agregados específicos”, en cada uno de los cuales encuadró especies filogenéticamente distintas pero con una morfología similar. Más tarde, Bisset revisó las especies de *Trichoderma* existentes, los “agregados específicos” y algunas formas anamórficas de *Hypocrea*, y propuso una división con cinco secciones en el género: TRICHODERMA, PACHYBASYUM, LONGIBRACHIATUM, SATURNISPORUM e HYPOCREA (Bisset, 1991).

Los primeros estudios no morfológicos, orientados a caracterizar cepas de *Trichoderma*, aplicaron características fisiológicas y/o bioquímicas como por ejemplo los perfiles de isoenzimas (Zamir y Chet, 1985; Stasz y col., 1989; Grondona y col.,

1997). En estudios posteriores, utilizando RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA-PCR*), secuencias de diferentes zonas del genoma o marcadores SCAR (*Sequenced Characterized Amplified Region*), se identificaron cepas y monitorizaron agentes de biocontrol (Muthumeenakshi y col., 1994; Arisan-Atac y col., 1995; Hermosa y col., 2000, 2001a; Rubio y col., 2005).

Los datos de secuencias de las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacers*) y de genes como los que codifican el factor de elongación de la transcripción  $1\alpha$  (*tefl*  $\alpha$ ) o la endoquitinasa 42 (*ech42*), han permitido establecer taxones moleculares (Kubicek y col., 2003), describir nuevas especies como *Trichoderma asperellum* (Lieckfeldt y col., 1999) o *Trichoderma parareesei* (Druzhinina y col., 2010), relacionar especies con su fase sexual (Chaverri y col., 2003), o distinguir y tipificar aquellas formas que son dañinas para los cultivos de champiñón (Hermosa y col., 1999, 2000; Samuels y col., 2002). En el año 2006 se publicó un listado de 100 especies del género *Trichoderma* identificadas a partir de secuencias de ADN (Druzhinina y col. 2006).

En la actualidad, el género está dividido en 16 *clades* que se agrupan en seis secciones: TRICHODERMA, PACHYBASYUM, LONGIBRACHIATUM, SATURNISPORUM, HYPOCREARUM y BREVICOMPACTUM (Druzhinina y col., 2011), y son reconocidas, por la Subcomisión Internacional de *Trichoderma/Hypocrea*, más de 150 especies (<http://www.isth.info/biodiversity/index.php>).

### 1.3. Ecología

*Trichoderma* incluye hongos de rápido crecimiento que aunque son habituales en suelos forestales y agrícolas (Klein y Eveleigh, 1998), se han aislado en todos los continentes (Hermosa y col., 2004). Los hongos de este género se desarrollan en una gran variedad de sustratos y bajo un amplio rango de temperatura, aunque muestran preferencia por los suelos ácidos y ricos en materia orgánica (Hubbard y col., 1983; Klein y Eveleigh, 1998; Druzhinina y col., 2010). En los trabajos más recientes, algunos basados en datos de metagenómica (Friedl y Druzhinina, 2012), se ha observado que el número de especies por ecosistema es bajo (Sadfi-Zouaoui y col., 2009).

Estos hongos del suelo, en principio, descomponedores de materia orgánica muerta, también actúan como parásitos alimentándose de otros hongos. Un análisis comparativo de los genomas de *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* ha demostrado que el micoparasitismo es la forma de vida ancestral del género *Trichoderma* y que, posteriormente, surgió la colonización de la rizosfera, hecho que se habría visto favorecido por la presencia en el suelo de patógenos y exudados de la raíz de las plantas (Kubicek y col., 2011). Varios estudios han mostrado que la colonización de la raíz por *Trichoderma* se limita a los espacios intercelulares sin alcanzar los vasos (Yedidia y col., 1999; Yedidia y col., 2000; Chacón y col., 2007), y que el hongo se beneficia de

los exudados de las raíces de la planta y de la protección del nicho a colonizar (Woo y Lorito, 2006; Rubio y col., 2012). Recientemente, utilizando cepas de *Trichoderma* marcadas y mutantes de *Arabidopsis*, se ha observado que el SA de la planta impide el acceso del hongo a su sistema vascular (Alonso-Ramírez y col., 2014). Además, algunas de las especies de *Trichoderma* tienen como hábitat tejidos de las plantas, donde se desarrollan como endófitas sin causar daños aparentes (Bailey y col., 2006, 2008; Bae y col., 2009).

Otro aspecto a destacar es la resistencia relativa de varias especies de *Trichoderma* a numerosos plaguicidas organoclorados de tipo endosulfan (Katayama y Matsumura, 1993; Shaban y El-Komy, 2001) o fungicidas de tipo bencimidazol (Mukherjee y col., 2003), todos ellos muy utilizados en agricultura. Esta condición, junto con su velocidad de crecimiento y su fácil adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas dan a *Trichoderma* ventaja, sobre otros muchos hongos filamentosos, en la colonización de suelos tras la aplicación de estos tratamientos, y hacen de estos hongos unos excelentes candidatos a agentes de control biológico.

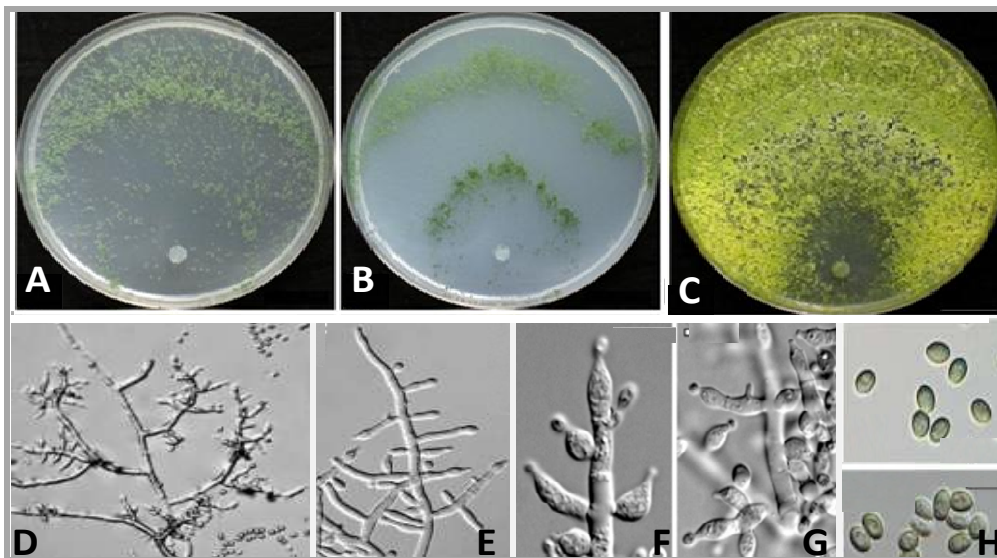
## **2. TRICHODERMA PARAREESEI**

*T. parareesei* es una especie que agrupa ancestros de *T. reesei/Hypocrea jecorina* productores de celulasas, descrita hace relativamente poco tiempo (Atanasova y col., 2010) (Figura 1). Por tanto, hasta la descripción de esta especie, sus cepas fueron consideradas como pertenecientes a *T. reesei/H. jecorina*. La cepa QM6a de *T. reesei*, una especie con excelente capacidad para producir enzimas celulolíticas y diversas aplicaciones en biotecnología, aislada por el Centro Quartermaster de Investigación y Desarrollo del ejército de EE.UU durante la segunda guerra mundial en la isla de Bougainville (Islas Salomón) (Reese y col., 1950), se consideró el ancestro de todas las cepas de *T. reesei* utilizadas en la industria pues, según parecía, poseía exclusivamente reproducción asexual. Sin embargo, estudios filogenéticos posteriores establecieron que *T. reesei* era un derivado clonal de *H. jecorina* que había perdido su capacidad de reproducción sexual (Kuhls y col., 1996). Y, trabajos más recientes han rechazado la clonalidad de QM6a (Seidl y col., 2009) y revelado una historia de recombinación en esta cepa similar a la de los aislamientos teleomórficos de *H. jecorina* (Druzhinina y col., 2010).

Estudios basados en el análisis de secuencias de fragmentos de genes que codifican la subunidad II de la ARN polimerasa (*rpb2*) y la quitinasa GH18 (*chi18-5*) (Atanasova y col., 2010), y fragmentos del gen *tef1 $\alpha$*  o de los genes que codifican la calmodulina 1 (*cal1*) y una proteína nuclear esencial (*las1*) (Druzhinina y col., 2010), han mostrado una sólida separación filogenética entre las especies *T. parareesei* y *H. jecorina*. Además, se han observados claras diferencias en el hábitat ocupado por esas dos especies. *H. jecorina* agrupan a la mayoría de las cepas aisladas de madera o plantas

en descomposición, mientras que *T. parareesei* engloba únicamente aislamientos obtenidos de suelo.

Ambas especies son cosmopolitas y aunque se han aislado en África (Ghana, Etiopía) y Asia (Sri Lanka, Indonesia), son más abundantes en Sudamérica y América Central (Druzhinina y col., 2010).



**Figura 1.** Morfología de *Trichoderma parareesei*: A) cultivo de 4 días en medio “Corn Meal Agar con 10% Dextrosa” (CMD), B) cultivo de 4 días en medio “Low Nutrient Agar” (SNA), C) cultivo de 4 días en medio Patata Dextrosa Agar (PDA), D) conidióforos de 9 días, E) conidióforos de 3 días, F) fiálidas de 2 días, G) fiálidas de 8 días y H) conidios (tomado de Atanasova y col., 2010).

*T. parareesei* alcanza su mayor crecimiento en un rango de temperatura entre 30 y 37°C, valores muy elevados en comparación con el rango de crecimiento óptimo de 24-28°C descrito para otras especies de *Trichoderma* e *Hypocrea*. De hecho, el micelio de *T. parareesei* cubre la superficie de una placa Petri que contenga un medio rico tras tres días de incubación a una temperatura entre 25 y 37°C. También se han observado diferencias entre *T. parareesei* y *H. jecorina* en la conidiación, mucho más abundante en la primera y siendo sus conidios de color verde amarillento o verde oscuro y brillantes. Como *T. parareesei* se adapta mejor que *H. jecorina* a diferentes condiciones de luz, la primera presentando su mayor crecimiento bajo condiciones de iluminación, y ambas especies muestran grandes diferencias en la asimilación de un gran número de fuentes de carbono, es plausible pensar que ambas especies ocupen nichos ecológicos separados. Además, *T. parareesei* presenta elevadas habilidades micoparasíticas frente a varios fitopatógenos mientras que las de *H. jecorina* son solo moderadas (Atanasova y col., 2010).

La incapacidad de reproducirse sexualmente implicaría que *T. parareesei* presentase un bajo nivel de polimorfismo que, teóricamente, la haría más vulnerable a

los cambios ambientales. Sin embargo, esta especie presenta una gran versatilidad fisiológica ya que es capaz de crecer y formar abundantes conidios utilizando una gran variedad de fuentes de carbono y en un amplio rango de temperaturas y posee una elevada habilidad micoparasítica, lo que la convierten en una especie fuertemente oportunista y con potencial como agente de biocontrol (Rubio y col., 2014).

### **3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO**

El control biológico es el uso de organismos beneficiosos para reducir los efectos negativos producidos por organismos indeseables y para promover respuestas positivas en las plantas. Una definición de control biológico capaz de dar cabida a las nuevas técnicas de biología molecular aplicadas a la biotecnología, la enunció la Academia Nacional de Ciencias de los EE.UU. (NAS, 1987): “Se conoce como control biológico a la utilización de organismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables, y para favorecer organismos útiles para el hombre, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos beneficiosos”. Por tanto, el biocontrol no solo se limita a controlar las enfermedades de las plantas, sino que también se relaciona con los beneficios directos que algunos microorganismos ejercen en las plantas (Shoreh y col., 2010).

Desde que Weindling en el año 1932 describiera la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* (ahora *Trichoderma viride*) sobre *Rhizoctonia* (Weindling, 1932), algunas de las especies de este género están entre los agentes de control biológico más utilizados en agricultura (Chet, 1987; Harman, 2000; Monte, 2001; Harman y col., 2008, 2010; Howell, 2003, 2006).

En la actualidad, se reconocen varios mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico: micoparasitismo, antibiosis, competencia con el patógeno, promoción del crecimiento de la planta, incremento de su tolerancia frente a estreses abióticos y estimulación de sus defensas frente a patógenos (Benítez y col., 2004; Harman y col., 2004; Lorito y col., 2010; Shoreh y col., 2010; Hermosa y col., 2012).

#### **3.1. Micoparasitismo**

Relación en la que *Trichoderma* (hongo parásito) se beneficia del hongo hospedador, del que obtiene nutrientes sin aportarle nada a cambio, causándole estrés o incluso la muerte. Cuando ocurre esto último se habla de parasitismo necrotrofo para diferenciarlo del parasitismo biotrofo, en el que se mantiene relación con células vivas durante largos periodos de tiempo.

Durante el proceso de micoparasitismo (Figura 2), en primer lugar, *Trichoderma* localiza al patógeno y comienza a crecer por quimiotropismo hacia éste (Lu y col., 2004). El gradiente químico, generado por los productos de hidrólisis de la pared celular de los hongos diana, se debe a una secreción secuencial de enzimas de degradación de pared celular. Aunque las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden seguir distintos patrones de inducción de genes que codifican este tipo de enzimas hidrolíticas, parece seguro que una exoquitinasa extracelular, producida de forma constitutiva a bajos niveles, podría estar implicada en este proceso. Esta exoquitinasa provoca la liberación de ciertos oligómeros de la pared del hongo diana, que inducen la expresión de genes que codifican endoquitinasas (Brunner y col., 2003; Harman, 2006) que al ser liberadas, difunden y hacen que *Trichoderma* comience el ataque al hongo diana antes de que se haya producido el contacto físico (Viterbo y col., 2002).

Una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* puede enroscarse alrededor de su presa y formar estructuras especializadas de tipo apresorio (Figura 2), con las que podrá penetrar en el interior de las hifas del patógeno. Esta unión parece estar mediada por la interacción entre carbohidratos (generalmente galactosa o fucosa) de la pared celular de *Trichoderma* y lectinas del hongo diana (Inbar y Chet, 1996; Rocha-Ramírez y col., 2002; Reithner y col., 2005; Zeilinger y col., 2005). Cuando ocurre el contacto, *Trichoderma* produce varias enzimas hidrolíticas y antibióticos como los peptaiboles que producirían poros en la pared celular del hongo parasitado (Schirmböck y col., 1994; Mukherjee y col., 2011).

Finalmente, *Trichoderma* digiere el contenido intracelular del hongo, fase que va acompañada de algunos cambios morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del hospedador (Benhamou y Chet, 1996) (Figura 2). En algunos casos, también se ha observado una esporulación de *Trichoderma* tras la completa digestión del hongo atacado (Elad y col., 1984).

Las principales enzimas degradadoras de pared celular implicadas en el micoparasitismo de *Trichoderma* son quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas,  $\beta$ -1,4-glucanasas,  $\beta$ -1,6-glucanasas y proteasas (Sanz y col., 2004).

La quitina, homopolímero de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (NAG) con uniones  $\beta$ -1,4 es uno de los polímeros más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y forma parte del exoesqueleto de insectos, de la cubierta de crustáceos y de huevos de nematodos y de la pared celular de hongos (Li, 2006). La hidrólisis enzimática de la quitina está catalizada por un sistema quitinolítico que envuelve endo y exoquitinasas (EC 3.2.1.14). De acuerdo a la clasificación CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes* database, <http://www.cazy.org/>), el sistema quitinolítico pertenece a la familia 18 de las glicosil hidrolasas (GH18) y N-acetil- $\beta$ -hexosaminidas (EC 3.3.1.52), miembros de la familia 20 de las glicosil hidrolasas (GH20). Las endoquitinasas rompen al azar los enlaces glicosílicos a lo largo de la cadena de quitina y las exoquitinasas rompen

progresivamente 2 unidades de extremos reducidos y no reducidos de la cadena de quitina. Las subunidades rotas pueden ser, a su vez, convertidas en monómeros de N-acetil-D-hexosaminas. Además, la quitina puede ser parcialmente deacetilada a quitosano por acción de las quitinadeacetilasas (EC 3.5.1.41), las cuales, están clasificadas dentro de la familia 4 de las carbohidrato esterasas (Grover, 2012; Gruber y Seidl-Seiboth, 2012).

Las quitinasas son las enzimas degradadoras de pared celular de *Trichoderma* mejor estudiadas ya que ellas están envueltas en la remodelación y reciclado de la propia pared del hongo y en la degradación de la pared celular de otras especies fúngicas (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012; Nicolás y col., 2014). El efecto antifúngico de las quitinasas se demostró, en ensayos *in vitro*, tras observar que su presencia en la mezcla de reacción inhibía el crecimiento o la germinación de las esporas de distintos hongos patógenos (Lorito y col., 1993). Posteriormente, la sobreexpresión de genes que codifican quitinasas mejoraba la capacidad antagonista de las cepas de *Trichoderma*, confirmando el efecto antifúngico de estas enzimas (Limón y col., 1999; Viterbo y col., 2001; Limón y col., 2004). Por ejemplo, la sobreexpresión en *T. atroviride* del gen *ThEn-42*, que codifica una endoquitinasa de *T. harzianum*, aumentaba su capacidad de biocontrol frente a *Penicillium digitatum* (Deng y col., 2007). Además, desde que en un trabajo pionero en el campo de la biotecnología se demostrara que plantas de tabaco y de patata que sobreexpresan el gen *ThEn-42* eran más resistentes a *Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani* (Lorito y col., 1998), son numerosos los trabajos que describen la utilidad de este tipo de genes para incrementar la resistencias de las plantas tanto a patógenos de suelo como a patógenos foliares (Nicolás y col., 2014).

Por su lado, las glucanasas agrupan un gran número de enzimas que degradan homopolímeros lineales o ramificados de D-glucosa unidos mediante enlaces  $\alpha$  y/o  $\beta$ . Las glucanasas se clasifican según el tipo de enlace sobre el que actúan y su modo de acción. Las más estudiadas, en *Trichoderma*, corresponden al grupo de las  $\beta$ -1,4-glucanasas o celulasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y  $\beta$ -1,6-glucanasas, aunque también se han descrito otras como las  $\alpha$ -1,3-glucanasas. Se han purificado numerosas  $\beta$ -1,3-glucanasas dentro del género *Trichoderma* que, en ensayos *in vitro*, han demostrado inhibir el crecimiento o la germinación de distintos hongos (de la Cruz y col., 1995b; El-Katatny y col., 2001). En *T. reesei* se han identificado al menos tres formas diferentes de endoglucanasas (EGI, EGII y EGIII), dos glucanocelobiohidrolasas (CBHI y CBHII) y distintas  $\beta$ -glucosidasas, que actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa (Hui y col., 2001).

Las  $\beta$ -1,6-glucanasas degradan polímeros de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,6, tanto en su modo endo (EC 3.2.1.75) como exo (EC 3.2.1.21). Se han purificado varias endo- $\beta$ -1,6-glucanasas de la cepa *T. harzianum* T34 (de la Cruz y col., 1995a; Montero y col., 2005) y clonado los genes relativos: *bgn16.2* (Lora y col., 1995), *bgn16.1* y *bgn16.3* (Montero y col., 2007). Estos trabajos las han relacionado

directamente con el micoparasitismo, ya que transformantes que sobreexpresan algunos de estos genes tienen mayor actividad antifúngica frente a hongos patógenos como *R. solani* o *Botrytis cinerea* que la cepa silvestre.

Finalmente, las proteasas que, por su naturaleza tan diversa, participan en una gran variedad de procesos fisiológicos como morfogénesis, nutrición, metabolismo y procesamiento de proteínas extracelulares para su activación (Howell, 2003). PRB1 fue la primera proteasa descrita en *Trichoderma*, una serín proteasa básica aislada y caracterizada en *T. harzianum* (Geremía y col., 1993). La incorporación de transformantes de *T. harzianum* que sobreexpresan el gen *prb1* a suelos infectados con *R. solani* reducía significativamente la enfermedad causada por este patógeno en plantas de algodón (Flores y col., 1997). También, otra serín proteasa de *T. harzianum* T34, PRA1, con efecto nematicida, se ha relacionado, por su patrón de expresión, con micoparasitismo (Suárez y col., 2004).



**Figura 2.** *Trichoderma* parasitando al hongo *Rhizoctonia solani*. En la foto de la izquierda, *Trichoderma* (T) parasita una hifa de *R. solani* (R), 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 (A). La barra equivale a 10  $\mu\text{m}$ . En la foto de la derecha, aparece una hifa de *Rhizoctonia* de la que se ha retirado la hifa de *Trichoderma*, observándose los poros provocados por el micoparásito en algunos puntos de unión entre ambas hifas (tomado de Harman y col., 2004).

### 3.2. Antibiosis

La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por los metabolitos secundarios producidos por otro, sin que medie contacto físico entre ellos. Los metabolitos secundarios, son moléculas no esenciales para el crecimiento del organismo, pero tienen un importante papel en señalización, desarrollo e interacción con



otros organismos (Keller y col., 2005; Hoffmeister y Keller, 2007; Osbourn, 2010), y son frecuentemente sintetizados cuando el crecimiento activo se detiene o bajo determinadas condiciones de cultivo, generalmente relacionadas con situaciones de estrés (Keller, 2005). Varios estudios donde se analiza comparativamente los genomas de *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* revelan la existencia de un amplio repertorio de genes putativos de la biosíntesis de metabolitos secundarios, no solo implicados en la inhibición del crecimiento de patógenos, sino también en la inducción de crecimiento y de resistencia en las plantas (Viterbo y col., 2007; Mukherjee y col., 2012; Vinale y col., 2012; Hung y col., 2013).

Durante varios años se ha utilizado una clasificación de los metabolitos de *Trichoderma* basada en la estructura química de las moléculas (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Reino y col., 2008), que los distribuía en dos grandes grupos: (1) metabolitos volátiles y de bajo peso molecular, que incluye compuestos aromáticos sencillos, algunos policétidos tales como pironas y butenolidas, terpenos volátiles y metabolitos de isociano, todos ellos compuestos relativamente apolares, y (2) metabolitos polares de alto peso molecular que, como los peptaiboles y los compuestos de tipo dicetopiperazinas, gliotoxina y gliovirina, pueden ejercer su actividad por contacto directo entre *Trichoderma* y sus antagonistas.

En la actualidad (Vinale y col., 2014), los metabolitos secundarios de *Trichoderma* más importante, considerando su actividad frente a fitopatógenos, son:

### 3.2.1. Pironas

La 6-pentil-pirona (6PP) posee olor a coco, es el compuesto mejor estudiado de este grupo y uno de los primeros volátiles antifúngicos aislados de *Trichoderma* (Vinale y col., 2008; Rubio y col., 2009; Mukherjee y col., 2012), y se aisló por primera vez en *T. viride* (Collins y Halim, 1972). Varios estudios indican que 6PP tiene efecto antifúngico contra hongos patógenos como *R. solani* (Claydon y col., 1987) *Fusarium oxysporum* (Scarselletti y Faull, 1994) y *Botrytis* spp. (Poole y col., 1998); y, a bajas concentraciones (1 ppm), activa los mecanismos de defensa de las plantas y regula su crecimiento, como se ha observado en guisante y tomate (Vinale y col., 2008).

Se han aislado de *Trichoderma* otros compuestos derivados de 6PP, como es el caso de la 6-pent-1-enil- $\alpha$ -pirona, capaz de inhibir el crecimiento de *R. solani* y *B. cinerea* (Cooney y Lauren, 1999) y la viridepironona, que presenta actividad antagonista frente a *Sclerotium rolfii* (Evidente y col., 2003). Además, se ha propuesto que muchos metabolitos derivados de la 6PP son producidos en *Trichoderma* como un mecanismo de destoxificación del hongo (Daoubi y col., 2009). Y, más recientemente, se ha observado que la pirona cistoporona S posee actividad antibiótica frente algunas bacterias y hongos (Ishii y col., 2013).

### 3.2.2. Cerinolactona

Una hidroxilactona aislada de *Trichoderma cerinum* y que presenta actividad frente a *B. cinerea*, *R. solani* y *Pythium ultimum* (Vinale y col., 2012).

### 3.2.3. Policétidos

Constituye el grupo más amplio de metabolitos secundarios fúngicos. Una policétido sintasa es un complejo multienzimático que participa en la biosíntesis de precursores de policétidos. Todos se originan a través de la unión de múltiples ácidos grasos de cadena corta, como acetato o propionato. Las policétido sintasa pueden, a su vez, estar relacionadas con genes de la ruta biosintética de otros antibióticos (Kennedy y col., 1999). Análisis de genomas de cepas de *Trichoderma* han revelado que *T. reesei* contiene 11 putativas policétido sintasa (Martínez y col., 2008), mientras que *T. atroviride* y *T. virens* poseen 18 (Kubicek y col., 2011). Hay poca información funcional sobre sus propiedades biológicas y su papel en biocontrol de *Trichoderma* y solo se ha observado una inducción de genes que codifican policétido sintasas durante el crecimiento de *Trichoderma* en medio sintético (Mukherjee y Kenerley, 2010). Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la disrupción del gen *tri4* en *Trichoderma arundinaceum* bloquea la formación de harzianum A (un trichoteceno) pero, paralelamente, se forman varias aspinolidas (policétidos), algunas de ellas con actividad antagonista frente a *B. cinerea* y con capacidad para inducir en tomate la defensas frente a este patógeno (Malmierca y col., 2014a).

Las koningininas son un tipo de policétidos aislado de *Trichoderma* spp. (Reino y col., 2008). Las koninginina A, B, D y E presentan actividad antibiótica *in vitro* frente al patógeno *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ishii y col., 2013). La koninginina D también inhibe *R. solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium middletonii*, *F. oxysporum* y *Bipolaris sorokiniana* (Dunlop y col., 1989). Y, recientemente, se han identificado las formas I, J y K de koninginina (Zhou, y col., 2014).

### 3.2.4. Terpenos

Constituyen el grupo de metabolitos secundarios más abundante y ampliamente distribuido en la naturaleza. Poseen actividades muy diversas tales como antibacteriana, antifúngica, antivírica, antiparasitaria, antitumoral y antiinflamatoria (Savoia y col., 2004; Trombetta y col., 2005; Chinworrungsee y col., 2008). Y, en los últimos años, han demostrado su potencial en biocontrol (Malmierca y col., 2012, 2013).

A diferencia de policétidos y peptaiboles, en la biosíntesis de los terpenos intervienen grandes proteínas individuales que participan en los diferentes pasos de su ruta biosintética que puede dividirse, a grandes rasgos, en cuatro grandes etapas: síntesis del precursor isopentil difosfato (IPP), producido en hongos por la ruta del mevalonato

(Daum y col., 2009); adición repetitiva de IPP para formar homólogos prenil difosfato que serían los precursores de las distintas clases de terpenos; conversión del prenil difosfato por terpeno sintetasas específicas en la producción de esqueletos terpénicos y modificaciones enzimáticas secundarias del esqueleto de carbono para dar los diferentes productos naturales (Dudareva y col., 2004).

Los compuestos terpénicos, formados por una o varias unidades de IPP, son: hemiterpenos (ej. isopreno), monoterpenos (mentol, alcanfor, geraniol, etc.), diterpenos (taxol), triterpenos (esterol) y sesquiterpenos (lignoreno y los trichotecenos). Está descrita la ruta de biosíntesis, incluyendo algunos genes reguladores, en varias especies de *Fusarium* (Brown y col., 2004; Kimura y col., 2007). En la actualidad, en *T. harzianum* se han aislado y caracterizado funcionalmente los genes que codifican las enzimas de algunas de esas etapas como el *erg1*, involucrado en el paso de escualeno a oxidoescualeno, y *erg7*, involucrado en el paso de oxidoescualeno a lanosterol (Cardoza y col., 2006b). También el gen *hmgR*, que codifica la hidroximetil glutaril CoA-reductasa, la enzima cabecera de la biosíntesis de terpenos (Cardoza y col., 2007). Recientemente, la sobreexpresión de *erg1* en *T. harzianum* ha mostrado que reduce su habilidad para inducir genes de defensa en tomate y su capacidad para colonizar las raíces de esta planta (Cardoza y col., 2014). El único representante del grupo de los diterpenos aislado de *Trichoderma* es la harzianodiona (Ghisalberti y col., 1992), pero no parece tener actividad antifúngica. También se han aislado un gran número de sesquiterpenos de *Trichoderma* que han mostrado tener actividad antibacteriana, antifúngica o neuroléptica (Bennett y Klich, 2003; Berg y col., 2004).

Las especies de *Trichoderma* pertenecientes al *clade* BREVICOMPACTUM tienen la habilidad de producir trichotecenos, una clase de sesquiterpenos que, en los últimos años han llamado la atención ya que se describieron como micotoxinas importantes de *Fusarium*, con fitotoxicidad y toxicidad para humanos y animales (Desjardins y Protror, 2007; McCormick y col., 2011). La identificación y caracterización de los genes *TRI* en *Trichoderma* ha mostrado que su organización difiere de aquella observada en *Fusarium* (Cardoza y col., 2011). *Trichoderma brevicompactum* y *T. arundinaceum* producen dos trichotecenos diferentes, trichodermina y HA, respectivamente. Mientras que la trichodermina posee actividad antilevadura y es fitotóxica (Tijerino y col., 2011b), HA es un trichoteceno no fitotóxico que retiene una significativa actividad antifúngica y que también induce genes de defensa frente a patógenos en la planta (Malmierca y col., 2012, 2013).

### 3.2.5. Isocianos

Compuestos muy inestables y de difícil aislamiento. Varios metabolitos isocianos denominados homothallinas, aislados de *Trichoderma koningii*, han mostrado actividad frente a *Phytophthora* spp. (Reino y col., 2008).

### 3.2.6. Viridina

Compuesto antifúngico aislado de especies como *T. koningii*, *T. viride* y *T. virens* (Golder y Watson, 1980; Singh y col., 2005), y con capacidad para inhibir la germinación de esporas de una gran variedad de hongos tales como *Botrytis allii*, *Colletotrichum lini*, *Fusarium caeruleum*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* o *Stachybotrys atra* (Brian y McGowan 1945; Ghisalberti, 2002).

### 3.2.7. Peptaiboles

Péptidos lineales con 7 a 20 residuos de aminoácidos y que presentan las siguientes características estructurales: a) una alta proporción de ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, b) el extremo N-terminal acilado, normalmente acetilado, y c) un amino alcohol en el extremo C-terminal, por ejemplo fenilalaninol, valinol, leucinol, isoleucinol o triptofanol (Cardoza y col., 2005, Daniel y Rodrigues, 2007).

Los peptaiboles son producidos por un gran número de cepas de *Trichoderma/Hypocrea* (Degenkolb y col., 2008; Hermosa y col., 2014), y se sintetizan por medio de péptido sintetasas no ribosómicas (NRPSs) que, gracias a un sistema modular semiautónomo, son responsables de la activación, modificación y condensación no ribosómica de los aminoácidos que integrarán la cadena final del peptaibol. Wiest y col. (2002) llevaron a cabo, en *T. virens*, la primera caracterización de un gen que codifica una NRPS de *Trichoderma* (*Tex1*). Posteriormente, se han aislado y caracterizado otros genes que codifican peptaiboles de diferentes subfamilias: *Salps1* y *Salps2* en *T. harzianum* (Vizcaíno y col., 2005, 2006a), *pbs1* en *T. atroviride* (Komon-Zelazowska y col., 2007), y *Tex2* en *T. virens* (Mukherjee y col., 2011).

En líneas generales, los peptaiboles presentan actividad antibiótica contra bacterias Gram positivas y hongos (Jen y col., 1987). Y actúan sinérgicamente con las enzimas degradadoras de pared celular en la inhibición de hongos fitopatógenos (Schirmböck y col., 1994; Lorito y col., 1994). Estos compuestos también han sido descritos como elicitores de respuesta de defensa de planta frente a patógenos (Engelberth y col., 2001). La aplicación de alameticina, un peptaibol proveniente de *T. virens*, induce una respuesta local y sistémica en planta (Maischak y col., 2010).

### 3.2.8. Compuestos de tipo dicetopiperazina

Gliotoxina y gliovirina son los metabolitos aislados de cepas de *Trichoderma* más importantes de este tipo de compuestos. Las cepas Q de *T. virens* que producen gliotoxina pero no gliovirina son activas frente a *R. solani*, mientras que las cepas P de esta misma especie que producen sólo gliovirina son capaces de inhibir a *P. ultimum* pero no a *R. solani* (Howell, 1999).

### 3.2.9. Harzianolida y ácido harziánico

La harzianolida se ha aislado de distintas cepas de *T. harzianum* (Almassi y col., 1991; Claydon y col., 1991; Ordentlich y col., 1992) y posee actividad antifúngica, así como el ácido harziánico, con propiedades antifúngicas y capaz de promover el crecimiento de las plantas (Vinale y col., 2009).

### 3.3. Competencia con el patógeno

Se entiende por competencia 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 ubicuidad de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo (Hermosa y col., 2004) es una prueba de que es un buen competidor por el espacio y por los recursos nutritivos. Por otra parte, la capacidad de colonizar la rizosfera de las plantas es un punto clave en el control biológico (Yedidia y col., 1999; Howell, 2003).

Se pueden encontrar varios ejemplos en los que se considera la competición por los nutrientes como responsable directa del efecto antagonista de *Trichoderma* frente a algunos patógenos (Howell y Stipanovic, 1995; Handelsman y Stabb, 1996; Lo y col., 1996). A pesar de todo, es difícil determinar hasta qué punto *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista sólo a través de la competición o si, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competición se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman, 2006).

La competición por carbono, nitrógeno y hierro juega un papel importante durante la interacción entre hongos beneficiosos y perjudiciales. *Trichoderma* es capaz de movilizar y tomar nutrientes del suelo más eficientemente que otros hongos, hecho que lo hace más competitivo (Vinale y col., 2008). También se ha relacionado la mayor capacidad de *T. asperellum* para movilizar hierro con su mayor habilidad para controlar enfermedades provocadas por *Fusarium* en tomate (Segarra y col., 2010).

### 3.4. Promoción del crecimiento de las plantas

Ya hace algunos años que se describió la capacidad de *Trichoderma* para promover el crecimiento y el desarrollo de las raíces laterales de las plantas (Chang y col., 1986; Yedidia y col., 2001), con el consiguiente incremento de la productividad en los cultivos (Harman y col., 2004, 2006). Para explicar este hecho se habían 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 (metales como hierro, zinc, manganeso y cobre) en formas que puedan ser utilizadas por las plantas (Altomare y col., 1999).

En los últimos años, varios trabajos que incluyen mutantes de plantas y transformantes de *Trichoderma* han demostrado que algunas cepas de este hongo pueden producir ácido indol acético (IAA), la auxina vegetal, regulando los niveles de esta hormona en la rizosfera (Contreras-Cornejo y col., 2009; Hoyos-Carvajal y col., 2009); incrementar la capacidad fotosintética (Vargas y col., 2009); o modificar la arquitectura de la raíz, aumentando el número de raíces secundarias y pelos radicales, para aumentar la toma de nutrientes (Samolski y col., 2012). Además, su capacidad para reducir la disponibilidad de etileno en las plantas, ya que disminuye los niveles de su molécula precursora mediante la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa o ACCD desaminasa, promueve el crecimiento de las mismas (Viterbo y col., 2010).

En este mismo sentido, varios trabajos científicos han demostrado que la presencia de metabolitos secundarios producidos por algunas cepas de *Trichoderma* tienen un efecto positivo en el desarrollo de las plantas (Vinale y col., 2012). Koninginina, 6PP, trichocarano, harzianopiridona, cerinolactona, HA, aspinolidas y ácido harziánico son algunos ejemplos de compuestos aislados de *Trichoderma* que promueven el crecimiento de la planta (Vinale y col., 2008; Vinale y col., 2012; Malmierca y col., 2012, 2013, 2014a).

Por otro lado, no todas las especies y/o cepas de *Trichoderma* estimulan el desarrollo de las plantas (Tucci y col., 2011; Hermosa y col., 2012; Rubio y col., 2012). Por ejemplo, *T. brevicompactum* produce efectos negativos en las plantas (Tijerino y col., 2011a) que se han relacionado con la producción de trichodermina por parte de las cepas de esta especie (Tijerino y col., 2011b). Y, *T. parareesei* (*T. reesei* en ese momento) ha mostrado buenas propiedades biofertilizantes en ensayos *in vitro* e *in vivo* (invernadero) (Rubio y col., 2014).

### **3.5. Incremento de las defensas de la planta frente a estreses bióticos**

Los vegetales son hipersensibles y, por su imposibilidad de huir, han elaborado estrategias asombrosamente hábiles de defensa pasiva y activa para hacer frente a los estreses a los que están sometidos. En las plantas, aquellas agresiones que proceden de otros seres vivos se denominan estreses bióticos.

#### **3.5.1. Defensas de las plantas**

Existen dos grandes tipos de defensa en las plantas: constitutiva e inducible. La constitutiva está formada por barreras estructurales tales como cutícula, lignina, ceras, etc., que intentan impedir la entrada de patógenos. Además de estas barreras, las plantas acumulan compuestos tóxicos (glucósidos, alcaloides, etc.), que en muchos casos poseen propiedades antimicrobianas, y que van a actuar en el lugar de penetración del patógeno. Cuando un microorganismo, superando esa primera línea defensiva o a través

de heridas o de estomas, accede al interior de la planta, se topa con la pared celular de las células que poseen receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), embebidos en la membrana citoplasmática, capaces de reconocer los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* o PAMPs). Éstos están muy conservados en diferentes tipos de microorganismos, y los más estudiados son la flagelina o los lipopolisacáridos de las bacterias, la quitina de los hongos y los  $\beta$ -glucanos de hongos y oomicetos. Una vez que los PAMPs son reconocidos por esos receptores se desencadena una respuesta de defensa local, poco específica, denominada *PAMP-Triggered Immunity* (PTI) (Chisholm y col., 2006). Los PRRs también reconocen los *Damage-Associate Molecular Patterns* (DAMPs), compuestos generados a partir de la planta por acción de enzimas hidrolíticas de los microorganismos como es el caso de los oligogalacturonidos (Bruce y Pickett, 2007). Sin embargo, esta respuesta defensiva local puede extenderse sistémicamente a otras partes de la planta lejos del punto de infección, estando este proceso mediado fundamentalmente por las fitohormonas SA, JA y ET, aunque parece que ABA, auxinas, citoquininas, giberelinas (GAs) y brasinoesteroides actuarían también como señalizadores de estas respuestas (Pieterse y col., 2009).

La PTI suele ser suficiente para mantener controlado al patógeno pero sería insuficiente frente a los patógenos adaptados (Tsuda y Katagiri, 2010), es decir, aquellos que han evolucionado bien con cambios que les permiten no ser reconocidos por los receptores PRR o bien secretando moléculas efectoras tales como proteínas Avr, coronatina, GAs, etc. que les permiten suprimir la PTI (Dodds y Rathjen, 2010). En este sentido, un patógeno puede producir de 20 a 30 efectores diferentes pero, a su vez, muy específicos. El aumento de la susceptibilidad de la planta causado por este tipo de moléculas se denomina *Effector-Triggered Susceptibility* (ETS) (Jones y Dangl, 2006).

Las plantas, por su lado, también han evolucionado desarrollando receptores citoplasmáticos que les permiten contrarrestar a las moléculas efectoras y desencadenar la *Effector-Triggered Immunity* (ETI). Destacan por su abundancia aquellos que poseen un dominio de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio rico en leucinas (LRR), los NBS-LRR. La ETI generalmente conlleva una respuesta de hipersensibilidad (HR) en el sitio de infección y suele proporcionar resistencia local efectiva frente a los patógenos con estilo de vida biotrofo y hemibiotrofo (Glazebrook, 2005). Sin embargo, también se ha observado, en contra de lo que se creía, que PAMPs como la flagelina y el péptido bacteriano flg22 son capaces de inducir HR (Naito y col., 2008).

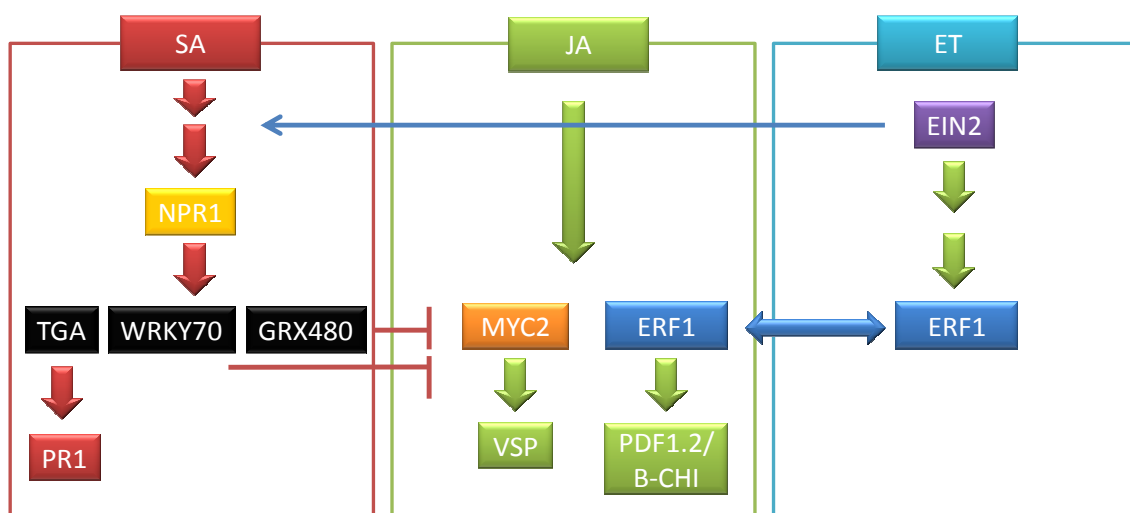
Ya que tanto microorganismos como plantas poseen múltiples efectores y receptores, respectivamente, la ETI se activa y reprime sucesivas veces siguiendo un modelo en zig-zag (Jones y Dangl, 2006), y la amplitud final de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad será proporcional a (PTI – ETS + ETI). Actualmente se cuestiona que PTI y ETI sean respuestas de defensa diferentes ya que ambas provocan cambios similares en el sitio de infección del patógeno (Pitzschke y col., 2009):

alcalinización del medio, apertura de canales iónicos, producción de estreses oxidativo y nitrosativo (Mur y col., 2013), activación de *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), reprogramación de la expresión de genes y reforzamiento de la pared celular mediante la acumulación de depósitos de calosa y lignina (Alonso-Ramírez y col., 2014), aunque la ETI es cualitativamente más fuerte y más rápida. Se ha propuesto que PTI es la versión débil de la ETI (Thomma y col., 2011).

La activación de la cascada de las MAPKs, vía sucesivas fosforilaciones, desencadena la unión de factores de transcripción con genes diana que regulan en las plantas desde el desarrollo y la muerte celular programada hasta las respuestas a los estímulos medioambientales y al ataque de los patógenos. Esa activación de la cascada de las MAPKs por la PTI o la ETI culmina en la expresión de genes de defensa y también en la síntesis de ciertas proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) tales como glucanasas y quininas, el fortalecimiento de la pared celular, el cierre de estomas y la síntesis de fitoalexinas, resultado en una resistencia a los patógenos, en la cual las hormonas de la planta regulan la producción de otras moléculas de defensa.

### 3.5.2. Redes de señalización en las defensas de la planta

En el proceso de defensa de las plantas es fundamental el balance entre todas las fitohormonas, que se logra mediante un complejo sistema de *cross-talk* hormonal, y que, a su vez, está equilibrado con el crecimiento vegetal. Está bien establecida la importancia de SA, JA y ET como señales primarias en la regulación del sistema inmune de la planta (Pieterse y col., 2009) (Figura 3).



**Figura 3.** *Cross-talk* hormonal entre las fitohormonas fundamentales en la señalización de respuestas de defensa frente a estreses bióticos. La relación SA-JA tiene un papel predominantemente antagónico que tiene lugar a través de las proteínas WRKY70 y GRX480. En esta interacción el ET también desempeña una función balanceadora ya que potencia la ruta del SA por la proteína EIN2. La relación ET-JA es sinérgica debido al factor de transcripción común ERF1 (adaptado de Pieterse y co., 2009).



Los patógenos biotrofos son generalmente sensibles a las respuestas reguladas por SA, el cual se requiere tanto para la resistencia local como para la sistémica, esta última conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR). Mientras que patógenos con estilo de vida necrotrofo, suelen sucumbir a las defensas controladas por JA y ET, que actúan como moléculas de traducción de señal de una respuestas sistémica denominada resistencia sistémica inducida (ISR). Esta última requiere la proteína NPR1 (*non-expressor of PR genes 1*), un regulador clave en la señalización de SA.

Las fitohormonas permiten a la planta establecer un balance entre procesos defensivos y procesos de desarrollo. Con frecuencia, las plantas están sometidas a la invasión de múltiples patógenos y microorganismos beneficiosos que pueden influir en la inducción de sus respuestas de defensa, la activación de diferentes mecanismos de defensa implicaría unos costes energéticos demasiado elevados para las mismas. Está bien documentado que los cambios moleculares que aumentan los niveles de SA reducen las defensas de respuesta a JA, y que el bloqueo de genes de respuesta a SA incrementa la expresión de genes inducidos por JA (Spoel y col., 2003; Koornneef y Pieterse, 2008; León-Reyes y col., 2009). El efecto antagónico JA-SA depende fundamentalmente de la proteína NPR1 (Figura 3), que activa genes de defensa de respuesta a SA como *PR-I*, además de factores de transcripción como WRKY70 o GRX480 que inhiben la expresión de genes de respuesta a JA (Pieterse y col., 2009). Se han descrito varios reguladores que controlan tanto la acumulación del SA inducido por patógeno, como la acumulación basal de la hormona, y la transducción de su señal, entre ellos se encuentra la proteína EDS1 y aquellas con las que interacciona (Dempsey y col., 2011). Aunque la producción de EDS1 se ve controlada por los niveles de SA mediante un bucle de retroalimentación positiva, se ha demostrado una ruta de señalización de resistencia dependiente de EDS1 pero independiente de la presencia de SA (Venugopal y col., 2009).

La traducción de señal del JA se inicia con la unión de la hormona activa, el jasmonoil-isoleucina (Ja-Ile), a su receptor COI1 (*Coronatine Insensitive 1*). COI1 forma parte del complejo de ubiquitinación SCF (Skp, Cullin, F-box), de manera que cuando se produce la unión con la hormona, se da la interacción entre COI1 y los represores transcripcionales JAZ (*Jasmonate-ZIM domain*), ocurriendo la degradación de éstos por el proteosoma y activándose la expresión de aquellos genes de respuesta a JA que estaban reprimidos (Figura 4). Entre ellos destaca el factor de transcripción MYC2, que a su vez regula la expresión de otros factores de transcripción y negativamente la suya propia. MYC2 es un regulador positivo de genes de respuesta a herida como *VSP* (*Vegetative Storage Protein*), y negativo de genes de respuesta a patógenos necrotrofos como *PDF1.2* (defensina) y *b-Chi* (quitinasa) (Kazan y Manners, 2013) (Figura 3). Por otro lado, la degradación de los JAZ también permite la expresión del factor de transcripción ERF1 (*Ethylene-Response Factor 1*), que induce la expresión de genes de respuesta a necrotrofos e inhibe la de aquellos de respuesta a herida (Lorenzo y Solano, 2005).

La ruta de transducción de ET, hormona gaseosa que se sintetiza de forma ubicua en las plantas a partir del precursor S-adenosil metionina, comienza con la inactivación de sus receptores -ETR1, ETR2 (*Ethylene Resistant 1 y 2*), ERS1, ERS2 (*ETR related sequence 1 y 2*) y EIN4 (*Ethylene Insensitive*)-, por la unión de la hormona a los mismos. Estas proteínas tienen una función redundante y una actividad represora sobre la cascada de señalización de ET pues activan la CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*), una proteína represora de la ruta. En presencia de ET, CTR1 está inactiva y permite la rotura de EIN2, una proteína transmembrana del retículo endoplasmático, resultado un fragmento que pasa al núcleo y controla la actuación de factores de transcripción primarios como EIN3 que, a su vez, regulan factores de transcripción como ERF1, punto de intersección entre las rutas del JA y del ET (Figura 3). ERF1 induce la expresión de genes de respuesta al ET, entre los que se encuentran los genes de defensa frente a necrotrofos (Li y Guo, 2007).

El *cross-talk* JA-SA resulta en un antagonismo recíproco entre ambos caminos y se ha interpretado como una estrategia adaptativa de las plantas para ahorrar energía frente a enemigos que son susceptibles a estrategias de defensa diferentes (Thaler y col., 2012). Por ejemplo, en *Arabidopsis* se suele priorizar el SA sobre el JA. Y, las plantas utilizan ET como una forma de priorizar la inducción de JA sobre SA en respuesta a múltiples atacantes.

En el caso de SA y ET, sugiere que existe una regulación positiva y negativa entre ambas hormonas, pero aun no está claro el proceso. Se ha visto que en tomate, el desarrollo de síntomas de la enfermedad producida por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* requiere tanto de SA como de ET, y la acumulación de SA en las plantas infectadas depende de la síntesis de ET (O'Donnell y col., 2001). Así también, en *A. thaliana*, SA y ET pueden funcionar juntos para inducir coordinadamente varios genes relacionados con la defensa (Schenk y col., 2000).

Al contrario que la relación SA-JA, la interacción JA-ET es sinérgica, potenciando el ET la acción del JA a nivel de los genes de respuesta a patógenos necrotrofos debido a la existencia de un nodo común a ambas rutas, el factor de transcripción ERF1 (Figura 3). Adicionalmente, el ET también desempeña un papel en la regulación de la ruta del SA, induciéndola a través de EIN2, y constituyendo por tanto, otro regulador del balance JA-SA (Pieterse y col., 2009).

Las relaciones beneficiosas entre las plantas y los microorganismos suelen ocurrir en la rizosfera y ayudan a la planta a superar los estreses bióticos o abióticos (Zamioudis y Pieterse, 2012). La raíz responde a diferentes *Microorganism-Associated Molecular Patterns* (MAMPs), y los microorganismos beneficiosos [rhizobia, hongos micorrícicos, rhizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) y hongos promotores del crecimiento (PGPF)], señalizan una defensa *MAMP-Triggered Immunity* (MTI), similar a la PTI descrita anteriormente.

### 3.5.3. *Trichoderma* y las defensas de la planta

Durante muchos años la capacidad de distintas cepas de *Trichoderma* para proteger a la planta frente a patógenos de raíz se atribuyó a un efecto directo sobre el patógeno (Chet y col., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que, al colonizar las raíces de la planta, *Trichoderma* estimula los mecanismos de defensa de la misma (Bailey y col., 1993; Yedidia y col., 1999; Korolev y col., 2008; Segarra y col., 2009; Hermosa y col., 2012, 2013) (Figura 4), lo que conlleva un incremento de su resistencia frente a varios microorganismos fitopatógenos e incluso nematodos (Monte y col., 2001; Harman y col., 2004).

Está demostrado que *Trichoderma* inicialmente coloniza la superficie de las raíces de la planta para, posteriormente, penetrar en las primeras capas de células de la epidermis (Yedidia y col., 1999; Chacón y col., 2007), donde permanece como un microorganismo simbiote avirulento (Harman y col., 2004; Woo y col., 2006), provocando cambios en la arquitectura de la raíz (Samolski y col., 2012) y otros cambios sistémicos que afectan a sus defensas frente a patógenos y estreses abióticos (Hermosa y col., 2012). También se ha demostrado que además de los depósitos de calosa, que se acumulan en la raíz ante la presencia de microorganismo del suelo, la producción de SA por la planta juega un papel determinante en confinar a *Trichoderma* al espacio apoplástico impidiendo su entrada en el sistema vascular (Alonso-Ramírez y col., 2014). Además se ha observado, mediante estudios transcriptómicos, que en las primeras horas de interacción de *Trichoderma* con la planta, en ésta ocurre una bajada de genes de defensa relacionados con las rutas de señalización de SA y JA, hecho que permitiría a *Trichoderma* colonizar la raíz (Morán-Diez y col., 2012).

A su vez, *Trichoderma* en el establecimiento de la interacción con la planta, produce una gran variedad de MAPMs y algunos DAMPs, como la endopoligalacturonasa ThPG1 (Morán-Diez y col., 2009), que activan la MTI (Hermosa y col., 2012). Entre los MAMPs que se han identificado hay desde xilanasas (Roblat y col., 2002) y celulasas (Martínez y col., 2001) hasta cerato plataninas (Djonovic y col., 2006; Seidl y col., 2006), e incluso metabolitos secundarios como 6PP y otros que, como se indicó anteriormente, a bajas dosis pueden actuar como MAMPs (Vinale y col., 2008, 2012).

Parece ser que debido a la producción de esa variedad de MAMPs, algunos poco comunes, la MTI desencadenada por *Trichoderma* es más fuerte que la PTI provocada por los patógenos (Lorito y col., 2010). Aunque solo se ha podido identificar una asociación MAMP-PRR, la de la xilanasas EIX de *T. viride* con el receptor LeEix2 (Ron y Avni, 2004), los genomas de *Trichoderma* son ricos en proteínas de unión a quitina con dominios de lisina (LysM) (Kubicek y col., 2011) y, por tanto, capaces de suprimir la respuesta PTI de la planta ya que secuestran quitooligosacáridos susceptibles de ser reconocidos por receptores PRR como el LysM-CERL1 (De Jonge y col., 2010).

Las respuestas de la planta a la colonización por *Trichoderma* incluyen la secreción de peroxidasa (Howell y col., 2000), la biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell, 2006), o la modificación de los niveles de JA, SA y ET (Harman y col., 2004; Lorito y col., 2010; Hermosa y col., 2013). Aunque también se sabe que *Trichoderma* es capaz de suprimir la producción de fitoalexinas (Masunaka y col., 2011) o degradar exudados fenólicos de la planta (Chen y sol., 2011).

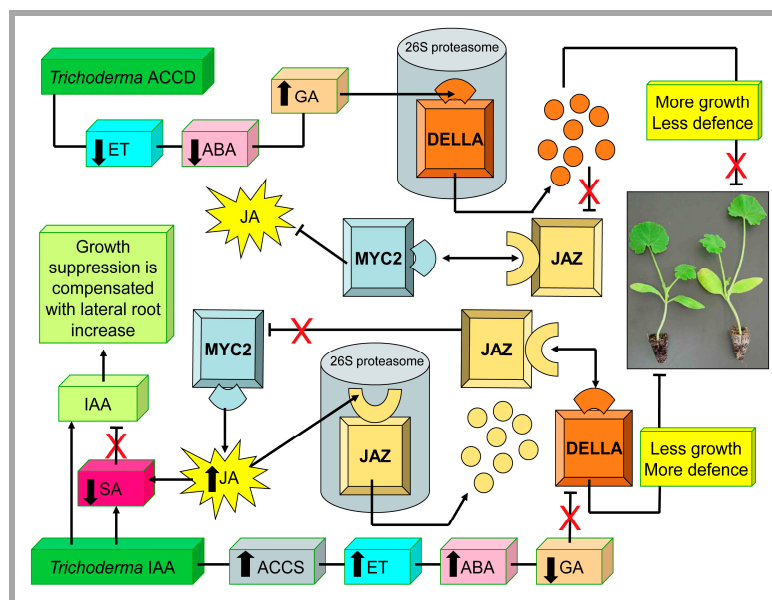
Por otro lado, y de forma similar a lo que ocurre con los patógenos, *Trichoderma* puede producir efectores que activan una respuesta ETI en la planta, pero en este caso de tipo *priming*. Varios trabajos han demostrado la existencia de *priming* por *Trichoderma* en ausencia de patógeno, es decir, estimular a la planta para responder de forma más rápida y más intensa frente a un ataque posterior de un patógeno (Shoresh y col., 2005; Djonovic y col., 2007; Segarra y col., 2007; Tucci y col., 2011; Malmierca y col., 2012, 2014a). En este sentido, se han identificado en *T. harzianum* y *T. atroviride* proteínas homólogas a los efectores 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; Shoresh y Harman, 2008). Por tanto, las respuestas defensivas provocadas por *Trichoderma* en la planta parecen cumplir también un modelo de zig-zag (Lorito y col., 2010).

Al contrario de los patógenos, que activan la SAR señalizada por SA y asociada con un incremento en la expresión de genes PR en la planta, *Trichoderma*, al igual que otras bacterias y hongos beneficiosos, generalmente activa ISR, la cual culmina en la acumulación de compuestos asociados a las rutas de JA y ET como son la fenilamonio liasa y la peroxidasa (Shoresh y col., 2005). Sin embargo, también se han descrito respuestas de tipo SAR causadas por *Trichoderma longibrachiatum* (Martínez y col., 2001), *T. virens* (Howell y col., 2003), *T. asperellum* (Segarra y col., 2007) o *T. harzianum* (Morán-Diez y col., 2009). Y además, se ha confirmado que plantas tratadas con *Trichoderma* pueden desencadenar la respuesta SAR durante largos periodos de tiempo, pero que cuando son posteriormente infectadas por un patógeno, pueden inducir genes de la ruta del JA que provocan la represión de genes del patógeno y que desencadenan una respuesta ISR prolongada en el tiempo (Tucci y col., 2011; Malmierca y col., 2012, 2014a). Por tanto, la separación de respuestas ISR y SAR no parece estar claramente delimitada.

La interacción entre *Trichoderma* y la planta es un proceso dinámico en el que según la cepa, la concentración aplicada, el tipo de material vegetal, el estado de desarrollo de la planta y el momento y duración de la interacción, se pueden solapar la expresión de genes señalizados por las rutas de JA/ET y/o SA (Hermosa y col., 2012). Además, ese diálogo no se puede separar de las respuestas defensivas de la planta frente a estreses medioambientales, formando un red interconectada en la que fitohormonas como IAA, ABA y GAs desempeñan también un papel importante (Pieterse y col.,

2009; Hermosa y col., 2013). Y, estudios transcriptómicos han demostrado también que *Trichoderma* inducen de forma activa cambios sistémicos en la fisiología de la planta, modulando la expresión de genes relacionados con estreses bióticos y abióticos (Alfano y col., 2007; Morán-Díez y col., 2012).

El *cross-talk* entre la señalización GA-JA y el balance DELLA-JAZ, regulado por MYC, son elementos clave que interrelacionan el crecimiento y las respuestas defensivas en la planta (Kazan y Manners, 2012, 2013). En *Trichoderma*, como se indicó en el anterior apartado 3.4, se ha descrito la producción de IAA y el descenso en la cantidad de ET en la planta debido a la acción de la enzima ACCD que sintetiza el hongo. Según esto y las interacciones existentes entre las diferentes fitohormonas, se ha propuesto un mecanismo por el que *Trichoderma* ayudaría a balancear las respuestas de defensa y de desarrollo en la planta (Hermosa y col., 2013) (Figura 4). El descenso de la cantidad de ET en la planta por acción de la ACCD de *Trichoderma* se traduce en la alteración de los niveles del resto de fitohormonas. Esa reducción de ET iría acompañada de una bajada en los niveles de ABA y consecuentemente, por su efecto antagónico, de una subida de los niveles de GAs. Ello ocasionaría, una bajada en los niveles de JA que provocaría un incremento del crecimiento en perjuicio de las defensas. Por otra lado, la producción de IAA, además de favorecer el desarrollo radicular de la planta, disminuye los niveles de GA y aumenta los niveles de JA, lo cual implicaría una parada del crecimiento y una promoción de las defensas.



**Figura 4.** Modelo hipotético de interacción fitohormonal *Trichoderma*-planta. El descenso en la cantidad de etileno (ET), provocado por acción de la ACC-deaminasa del hongo, y la producción de ácido indol acético (IAA), producen cambios en la red hormonal de la planta que determinan el equilibrio crecimiento/defensa de la misma. ABA: ácido abscísico, GA: giberelinas, JA: ácido jasmónico, ACCD: 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminasa, ACCS: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa, MYC2: factor de transcripción de genes de respuesta a JA, DELLA: reguladores negativos de la señalización de GA, y JAZ: proteínas *jasmonate ZIM domain*, reguladores negativos de la señalización de JA (tomada de Hermosa y col., 2013).

### 3.6. Incremento de la tolerancia de la planta frente a estreses abióticos

Los efectos beneficiosos de *Trichoderma* en plantas sometidas a estreses abióticos están bien documentados (Donoso y col., 2008; Bae y col., 2009; Shores y col., 2010), aunque muchos de los factores que controlan el estrés en las plantas son todavía desconocidos.

Mastouri y col. (2010) publicaron que el tratamiento de semillas de tomate con *T. harzianum* acelera su germinación, incrementa el vigor de las plántulas y aminora los efectos provocados por estreses térmico, osmótico, salino e hídrico, ya que induciría cambios fisiológicos en la planta contra los daños oxidativos. Estas respuestas son comparables a los efectos provocados por *Piriformospora indica* durante su simbiosis con la planta (Vadassery y col., 2009). Un mecanismo común a través del cual los hongos beneficiosos y las bacterias PGPR aumentan la tolerancia de éstas a los estreses abióticos, sería la disminución del daño causado por la acumulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) que ocurre en las plantas estresadas (Mastouri y col., 2010).

## 4. APLICACIONES DEL GÉNERO *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* poseen características que las dotan de un gran interés no solo para la agricultura, sino también para las industrias biotecnológicas (alimentaria, textil, farmacéutica y ambiental). La importancia y versatilidad de este género, ha favorecido la secuenciación del genoma de cepas de *T. reesei* (Martínez y col., 2008), *T. virens* y *T. atroviride* (Kubicek y col., 2011), *T. asperellum*, *T. harzianum*, *Trichoderma citrinoviride* y *T. longibrachiatum* (Grigoriev y col., 2012; Xie y col., 2014), y *Trichoderma hamatum* (Studholme y col., 2013), aumentando el conocimiento que se tiene de las mismas.

La capacidad de algunas cepas de *Trichoderma* para secretar gran cantidad de proteínas, las convierte en una alternativa como fábricas celulares para la producción de proteínas con diferentes fines biotecnológicos, y para las cuales, ya se dispone de sistemas de transformación eficaces (Cardoza y col., 2006a; Steiger, 2011). El mejor ejemplo de especies de *Trichoderma* con interés industrial es *T. reesei/H. jecorina*, su eficiente maquinaria de producción y secreción de celulasas (celobiohidrolasa I y II, y endoglucanasas I y II) ha dirigido su explotación comercial hacia áreas tan diversas como las fermentaciones alcohólicas, los detergentes para el lavado de ropa, el blanqueo del papel, la alimentación animal o la producción de combustible (Rosgaard y col., 2007; Seidl y col., 2008; Rahman y col., 2009; Schuster y col., 2012).

Sorprendentemente, aunque *T. reesei/H. jecorina* es la especie con mayor importancia biotecnológica por la producción industrial de enzimas hidrolíticas, estudios comparativos de genomas revelan que posee un número menor de genes

celulolíticos y hemicelulolíticos que *T. virens* y *T. atroviride* y que, a su vez, explicaría su menor habilidad micoparasítica (Kubicek y col., 2011). Sin embargo, trabajos más recientes han mostrado que *T. parareesei*, filogenéticamente muy próxima a *T. reesei/H. jecorina*, posee una elevada capacidad antagonista, más próxima a *T. virens* y *T. atroviride* que a *T. reesei* (Atanasova y col., 2010; Druzhinina y col., 2010; Rubio y col., 2014).

*T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *Trichoderma gamsii*, *T. viride* y *T. virens* son las especies más citadas en biocontrol ya que algunas de sus cepas se utilizan como agentes de control biológico agricultura por su capacidad antagonista frente a fitopatógenos ascomicetos, basidiomicetos, oomicetos e incluso nematodos (Monte, 2001; Goswami y col., 2008; Jiménez-Díaz y col., 2010a; Lorito y col., 2010). Precisamente el primer registro internacional en España de cepas de *Trichoderma* como materia activa fungicida corresponde a TUSAL<sup>®</sup>, una patente de la Universidad de Salamanca (Hermosa y col., 2001b).

Algunas cepas con capacidad para promover el crecimiento de las plantas e inducir respuestas de defensa frente a estreses bióticos y abióticos (Altomare y col., 1999; Harman, 2006; Lorito y col., 2010; Shores y col., 2010; Hermosa y col., 2012, 2013) tienen interés como biofertilizantes.

Algunas especies de *Trichoderma* han sido incluidas en programas de manejo integrado de patógenos, por el efecto sinérgico que han demostrado al combinarse con algunos agentes químicos y que permite reducir las cantidades de fungicidas y pesticidas químicos (Shtienberg y Elad, 1997; Harman y col., 2004; Jiménez-Díaz y col., 2010b).

También, las especies de *Trichoderma* se usan en la biorremediación de los suelos (Hadibarata y col., 2007; Cao y col., 2008). En un estudio reciente se demuestra que cepas de *T. harzianum* y *T. atroviride* son capaces de aliviar la fitotoxicidad de plantas de lechuga irrigadas con agua contaminada con arsénico (Caporale y col., 2014).

Además, las especies de *Trichoderma* pueden ser una buena fuente de genes cuya aplicación biotecnológica esté dirigida hacia la obtención de plantas transgénicas con resistencia a enfermedades (Lorito y col., 1998; Dana y col., 2006) y a estreses abióticos (Dana y col., 2006; Montero-Barrientos y col., 2010). En una reciente revisión (Nicolás y col., 2014) se recoge numeroso trabajo que muestran cómo la sobreexpresión en plantas tan diversas como tabaco, patata, limonero, petunia, etc. de genes de *Trichoderma* que codifican diferentes quitinasas y/o glucanasas, aumenta su resistencia a patógenos y estreses abióticos, además de la utilidad de las plantas como biofactorías para producir celobiohidrolasas y xilanasas de *Trichoderma* activas y con utilidad industrial. El disponer de cada vez más genomas secuenciados de hongos de este género (Martinez y col., 2008; Kubicek y col., 2011) incrementará el abanico de

genes candidatos a ser sobreexpresados en levaduras y plantas y, por ende, se diversificarán más aún sus aplicaciones biotecnológicas.

## 5. BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS

Los aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp) se sintetizan, vía corismato, en la ruta del shikimato. Se ha descrito la ruta del shikimato en procariotas, algas, hongos y plantas (Weiss y Edwards, 1980; Helmstaedt y col., 2001). Los animales, incluido el hombre, carecen de la capacidad de sintetizar directamente los aminoácidos aromáticos, por lo que deben ser suplementados con la alimentación, especialmente Phe y Trp, ya que Tyr se sintetiza a partir de Phe.

En bacterias y hongos, la ruta el shikimato opera en el citosol, mientras que en plantas, además de en el citosol, se encuentra en los plastidios (Eberhard y col., 1996; Roberts y col., 2002). En bacterias, Tyr, Phe y Trp se destinan casi exclusivamente a la formación de proteínas, mientras que en plantas, además de a la síntesis de proteínas, estos aminoácidos son precursores de una gran variedad de metabolitos secundarios con múltiples funciones biológicas que van desde la pigmentación de las plantas, inducción del crecimiento, defensa contra patógenos, protección frente a luz UV y lignificación de tejidos, hasta la formación fitohormonas (Vogt, 2010).

La formación de estos aminoácidos aromáticos en la ruta del shikimato se inicia con la condensación de eritrosa 4-fosfato (E4P) y fosfoenolpiruvato (PEP) por acción de la enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosanato-7-fosfato sintasa (DAHPS), y luego se requieren siete reacciones consecutivas e invariables, catalizadas por 6 enzimas diferentes, para producir corismato, el intermediario central de la síntesis de Tyr, Phe y Trp (Chook y col., 1994, Tzin y Galili, 2010) (Figura 5A).

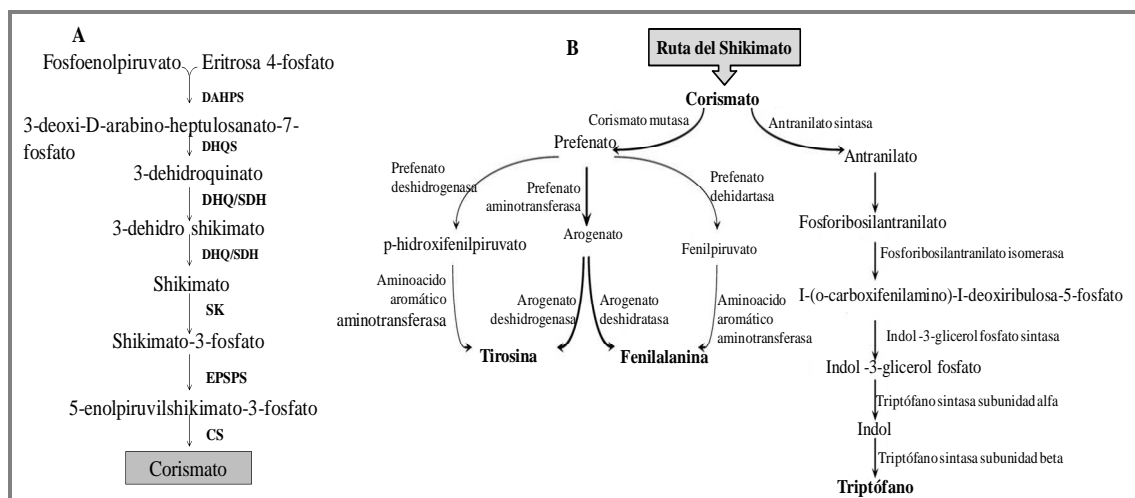
Una vez formado el corismato son necesarios dos caminos diferentes para la síntesis de los aminoácidos aromáticos (Figura 5B). Por un lado y de manera general, el corismato es convertido en prefenato por acción de la enzima corismato mutasa (E.C. 5.4.99.5), para producir Tyr y Phe, y por otro lado, corismato es convertido en antranilato por la antranilato sintasa para la formación de Trp. Por consiguiente, el corismato es un sustrato por el cual compite tanto la corismato mutasa como la antranilato sintasa (Sträter y col., 1997).

A partir del prefenato, la síntesis de Tyr y Phe puede producirse por dos rutas separadas. Una primera ruta (considerada principal), es mediante la conversión de prefenato en arogenato mediado por la enzima prefenato aminotransferasa. Por un lado, arogenato produce Tyr por la acción de la enzima arogenato deshidrogenasa, y por otro lado produce Phe por acción de la enzima arogenato deshidratasa (Connelly y Conn, 1982; Rippert y Matringe, 2002). Una vía alternativa para la síntesis de Tyr y de Phe es,



la conversión de pefenato en 4-hidroxifenilpiruvato o en fenilpiruvato por la enzima pefenato deshidrogenasa o la pefenato deshidratasa, respectivamente, y posteriormente producir la Tyr o la Phe. Se ha demostrado que esta vía alternativa está sujeta a regulación y sólo es eficiente si existe una concentración elevada de pefenato (Rippert y Matringe, 2002; Rippert y col., 2009). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han detectado la 4-hidroxifenilpiruvato y la fenilpiruvato (Herrman,. 1983).

El Trp, en todos los organismos estudiados hasta la fecha, se produce en cinco pasos enzimáticos invariables (Figura 5B). En la biosíntesis de Trp, la enzima antranilato sintasa convierte corismato en antranilato. La segunda enzima de la ruta, es la antranilato fosforibosil antranilato transferasa, convierte antranilato y fosforibosilpirofosfato en fosforibosil antranilato y fosfato inorgánico. Seguidamente, la enzima fosforibosil antranilato isomerasa convierte fosforibosil antranilato en I-(0-carboxifenilamino)-I-deoxiribulosa-5 fosfato. La cuarta enzima es la indol-3-glicerol fosfato sintasa, la cual cataliza la formación de indol-3-glicerol fosfato desde I-(0-carboxifenilamino)-I-deoxiribulosa-5 fosfato (Li y col., 1995). Y, los últimos dos pasos de la síntesis de Trp son catalizado por la enzima triptófano sintasa por la conversión de indol-3-glicerol fosfato a indol y este último a Trp.



**Figura 5.** Ruta del shikimato. A) Etapas iniciales para la formación del corismato, donde las enzimas que catalizan los distintos pasos son: DAHPS (3-deoxi-D-arabino heptulosanato-7-fosfato sintasa), DHQS (3-dehidroquianato deshidratasa), DHQS/SDH (3-dehidroquianato deshidratasa y shikimato 5-deshidrogenasa), SK (shikimato kinasa), EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa), CS (corismato sintasa). B) Representación de las etapas de la ruta que van desde el corismato hasta los aminoácido aromáticos Tyr, Phe y Trp.

La regulación de la ruta de los aminoácidos aromáticos ha sido ampliamente estudiada en bacteria por su utilidad en la industria alimentaria y farmacéutica, y en plantas para la producción de glifosato (N-fosfometilglicina), herbicida que tiene como diana la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) para inhibir la síntesis

de aminoácidos aromáticos (Baird, 1971; Jaworski, 1972, Amrhein y col., 1980). Algunas investigaciones revelan diferencias en la biosíntesis del shikimato entre bacterias, hongos y plantas, sugiriendo diferentes modos de regulación e inhibición de la ruta (Roberts y col., 2002). Por ejemplo, la actividad de la enzima DAHPS en varios microorganismos está regulada por retroalimentación de los aminoácidos aromáticos (Byng y col., 1983; Knaggs, 2001), aunque no hay evidencias de que esta regulación ocurra en planta (Herrmann y Weaver, 1999). En los microorganismos, DAHPS puede existir como tres isoenzimas diferentes: DAHPS sintasa-Tyr, DAHPS sintasa-Phe o DAHPS sintasa-Trp, para los referidos aminoácidos Tyr, Phe y Trp, y, según el organismo, este complejo enzimático puede estar presente en una, dos o en las tres formas citadas. En *Escherichia coli* o en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* se han encontrado las tres DAHPS sintasa, cada una de la cual, es regulada por su aminoácido aromático correspondiente (Hoffmann y col., 1972; Nimmo y Coggings, 1981). En *S. cerevisiae* existen dos isoenzimas DAHPS sintasa inhibidas por retroalimentación, respectivamente, de Tyr y Phe (Pittard, 1996). Sin embargo, la regulación de la corismato mutasa encontrada en *Bacillus subtilis* es inhibida por prefenato pero sobre la que no tienen efecto ninguno de los tres aminoácidos aromáticos (Nasser y col., 1969). Y, se ha visto que en plantas la corismato mutasa es inhibida normalmente por retroalimentación de Tyr y Phe pero el Trp es un activador que permite mantener el balance de estos aminoácidos aromáticos (Eberhard y col., 1996).

Como productos finales de la ruta de los aminoácidos aromáticos se han identificado los alcoholes aromáticos tirosol (2-[4-hydroxyphenil] etanol), feniletanol y triptofol producidos a partir de Tyr, Phe y Trp, respectivamente. Algunos de estos compuestos se han relacionado con importantes procesos morfológicos y fisiológicos en levaduras (Chen y col., 2004; Chen y Fink, 2006; Gori y col., 2011).

La formación de tirosol como producto de la síntesis de Tyr tiene lugar a través de varios pasos: inicialmente, la transaminación de Tyr para producir 4-hidroxifenilpiruvato mediado por la enzima aminotransferasa, posteriormente, este compuesto sufre una descarboxilación por la enzima piruvato descarboxilasa para producir 4-hidroxifenilacetaldehído, que luego es reducido a tirosol por una alcohol deshidrogenasa (Hazelwood, y col., 2008). El feniletanol se sintetiza a partir de Phe, vía fenilacetaldehído, por la acción de las enzimas piridoxal-5-fosfato dependiente de aminoácido aromático descarboxilasa y fenilacetaldehído reductasa (Sakai y col., 2007). Y, el Trp es convertido en triptofol vía indol-3-piruvato e indol-3-aldehído (Kradolfer y col., 1982; Furukawa y col., 1996).

El tirosol es un compuesto fenólico bien conocido por estar presente en aceite de oliva y vino (Covas y col., 2003). Es un tipo de antioxidante natural con efecto en la eliminación de ROS y óxido nítrico (de la Puerta y col., 2001), y propiedades antiinflamatorias (Giovannini y col., 2002) y neuroprotectoras (Bu y col., 2007). Se ha detectado en diferentes géneros de levaduras y hongos filamentosos, incluido

*Trichoderma* (Tarus y col., 2003; Daoubi y col., 2009; Tijerino y col., 2011b), pero se desconoce su función en este hongo.

Los alcoholes aromáticos tirosol, feniletanol y triptofol pueden influenciar en los cambios morfológicos que ocurre en algunos microorganismos. Tanto el tirosol como el feniletanol, se han identificados como moléculas señalizadoras o de *quorum sensing* que estimulan el crecimiento pseudohifal en *Candida albicans* y *S. cerevisiae* (Chen y col., 2004; Alem y col., 2006; Chen y Fink, 2006; Gori y col., 2011). En cultivos de *Debaryomyces hansenii*, esos compuestos se han identificados al final de la fase exponencial, aunque la detección de triptofol solo era posible cuando se adicionaba Trp al medio (Gori y col., 2011).

En el conjunto de los casos, el tirosol parece ser el compuesto de mayor relevancia como molécula señalizadora. En levaduras, acelera la transición de la fase levaduriforme a la fase hifal o el crecimiento del tubo germinativo (Chen y col., 2004), haciendo a las cepas más agresiva en su proceso invasivo (Mohammed y col., 2006). Sin embargo, este efecto señalizador no se ha podido observar en cultivos de *Paracoccidioides brasiliensis* en presencia de hasta 300  $\mu\text{M}$  de tirosol (Derengowski y col., 2009).

## 6. “ÓMICAS” EN *TRICHODERMA*

La mayor parte de los proyectos de genómica funcional comienzan por la obtención y análisis de colecciones de *Expressed Sequence Tags* (ESTs). Estas colecciones se obtienen a partir de clones de ADNc que se secuencian parcialmente, por lo que derivan de genes que se expresan en unas condiciones determinadas y un tiempo concreto. Las ESTs se agrupan en conjuntos de secuencias redundantes (*contigs*) y no redundantes (unisequencias) en los que cada grupo representa un gen putativo único en el genoma del organismo (Skinner y col., 2001).

Ya que los hongos filamentosos constituyen la base de muchas aplicaciones biotecnológicas (desarrollo y producción de antibióticos y enzimas industriales), son muy numerosos, desde finales del siglo XX, los estudios de ESTs en ellos, ejemplo: *Neurospora crassa* (Nelson y col., 1997), *Verticillium dahliae* (Neumann y Dobinson, 2003), *Metarhizium anisopliae* (Freimoser y col., 2003), *Gibberella zeae* (Trail y col., 2003) o *Aspergillus oryzae* (Maeda y col., 2004).

En *Trichoderma* se han publicado varios trabajos de genómica basados en la generación de ESTs. Los realizados con *T. reesei*, para identificar enzimas y reguladores implicados en la degradación de biomasa (Chambergó y col., 2003; Foreman y col., 2003; Diener y col., 2004; Arvas y col., 2006), y los realizados en *T. harzianum*, para identificar genes de biocontrol (Liu y Yang, 2005). En este sentido,

dentro del proyecto *TrichoEST*, financiado por la Unión Europea (<http://www.trichoderma.org>), que tenía como objeto la identificación de genes y productos génicos de *Trichoderma* spp. con alto valor biotecnológico, en nuestro grupo de investigación se obtuvieron 8.710 ESTs de *T. harzianum* CECT2413, que generaron 3.478 secuencias únicas (Vizcaíno y col., 2006c), y 8.160 ESTs de otras cuatro cepas diferentes de *Trichoderma* spp. (Vizcaíno y col., 2007).

Además, todas estas colecciones de ESTs de *Trichoderma* han servido de gran ayuda en la anotación de los genomas de *T. reesei* QM 9414 (Martínez y col., 2008), *T. virens* Gv29-8 y *T. atroviride* IMI206040 (Kubicek y col., 2011) que, a su vez, han sido útiles en la anotación de los genomas secuenciados más recientemente: *T. asperellum* CBS 433.97, *T. harzianum* CBS 226.95, *T. citrinoviride* CBS 258.85 y *T. longibrachiatum* ATCC 18648, disponibles en el portal del DOE *Joint Genome Institute* (<http://genome.jgi.doe.gov/Trichoderma/Trichoderma.info.html>) (Grigoriev y col., 2012), *T. hamatum* GD12, cuya secuencia se encuentra depositada en la base de datos *DDBJ/EMBL/GenBank* bajo el número de acceso ANCB000000000 (Studholme y col., 2013) y *T. longibrachiatum* SMF2 (Xie y col., 2014).

En la última década, se ha aplicado la proteómica en estudios de hongos de interés biotecnológico. En *Trichoderma* hay relativamente pocos estudios de este tipo (Hermosa y col., 2010). Los trabajos se han centrado en analizar el proteoma de cepas de biocontrol para identificar factores clave en interacciones hongo-*Trichoderma* y *Trichoderma*-planta, y relacionarlos con las respuestas del hongo durante las relaciones de simbiosis, antagonismo, etc. que establecen (Suárez y col., 2005; Marra y col., 2006; Morán-Diez y col., 2009).

En el campo de la transcriptómica, el uso de *macroarrays* y *microarrays* representa una herramienta muy útil para estudiar, de forma simultánea, la expresión de cientos y miles de genes, respectivamente (Ju y col., 2009).

Se han utilizado *macroarrays* para identificar los genes del hongo que se ven afectados al interactuar con plantas como cacao o tomate (Bailey y col., 2006; Chacón y col., 2007). En los trabajos más recientes se han utilizado *microarrays* de *Trichoderma* para analizar los cambios de expresión de genes de *T. harzianum* bajo condiciones de micoparasitismo y de interacción con plantas de tomate (Samolski y col., 2009) y para comparar los cambios transcriptómicos de diferentes cepas durante su micoparasitismo sobre un patógeno (Atanasova y col., 2013) o en las primeras horas de interacción con plantas de tomate (Rubio y col., 2012, 2014). Además, se han empleado *microarrays* como herramientas complementarias durante los análisis de mutantes de *Trichoderma* (Montero-Barrientos y col., 2011).

Por otro lado, también se han analizado mediante *Chips* las respuestas sistémicas de plantas de tomate o de *Arabidopsis* a la colonización por cepas silvestres y mutantes de *Trichoderma* (Alfano y col., 2007; Morán-Diez y col., 2009, 2012).

### 6.1. Estrategias para el estudio de la función génica

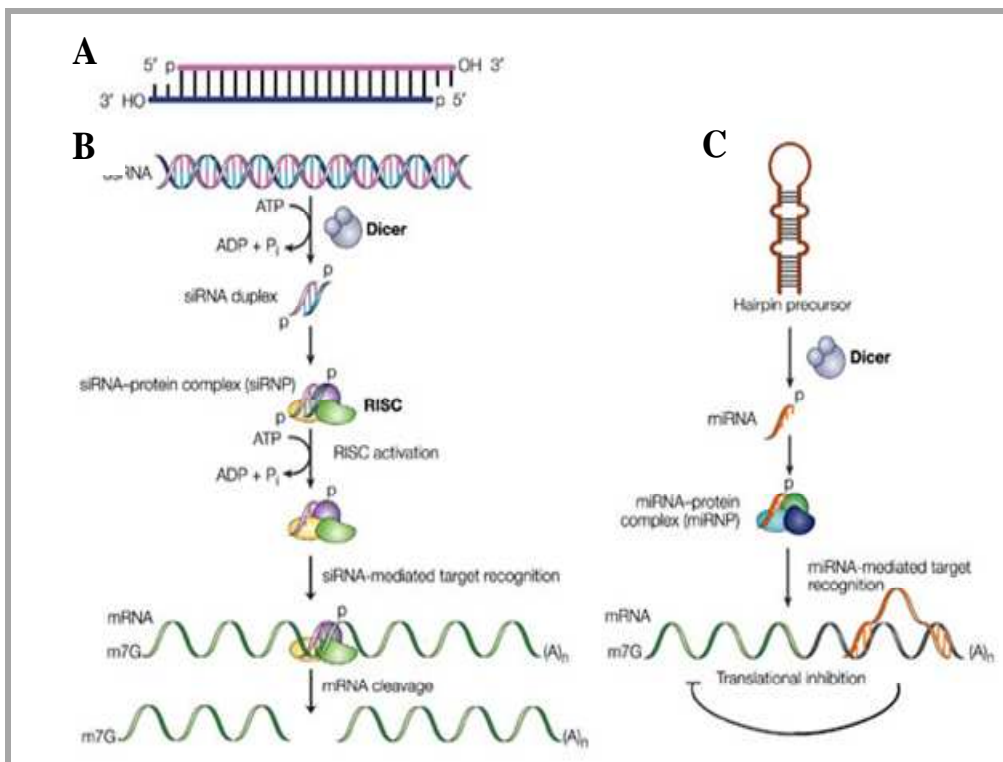
Una estrategia para determinar la función biológica de una proteína es examinar el fenotipo de organismos que contienen mutaciones en el gen codificante para la misma. Una vía de estudio puede ser aislar mutantes nulos mediante el escrutinio de una colección previamente obtenida por mutagénesis o, si es posible, mediante la interrupción del *locus* de interés utilizando *cassettes* apropiados, mostrándose esta última aproximación como la más útil y efectiva. Sin embargo, existen muchos organismos en los que esta técnica no representa una herramienta eficaz, ya que depende directamente de la frecuencia de recombinación homóloga propia de cada sistema. *Trichoderma* presenta uno de los casos en los que la frecuencia de recombinación homóloga es baja (alrededor del 2% en *T. reesei* y muy inferior en *T. harzianum*) aunque varía según la cepa (Mach y Zeilinger, 1998). Se han descrito algunos casos de interrupciones génicas en *T. virens*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *T. arundinaceum* y *T. harzianum* (Mach y col., 1994; Wilhite y col., 2001; Zeilinger, 2004; Rosado y col., 2007; Rubio y col., 2008; Ruocco y col., 2009; Malmierca y col., 2012, 2013).

Otra de las estrategias para analizar la función de los productos génicos consiste en la sobreexpresión de los genes en sistemas homólogos o heterólogos. La sobreexpresión de genes implicados en el micoparasitismo se ha utilizado como estrategia para incrementar la capacidad antifúngica de numerosas cepas de *Trichoderma*. Por citar sólo algunos ejemplos, la sobreexpresión en *T. longibrachiatum* (una especie no considerada agente de biocontrol) del gen que codifica una  $\beta$ -1,4-endoglucanasa incrementó su capacidad antagonista frente a *P. ultimum* (Migheli y col., 1998); la sobreexpresión de *ThPTR2* en *T. harzianum* demostró que la proteína codificada por este gen era un transportador de dipéptidos Leu-Leu (Vizcaíno y col., 2006b); transformantes de *T. harzianum* que sobreexpresan el gen de *T. virens* que codifica la proteína de choque térmico HSP23, mostraron una mayor resistencia a temperaturas extremas (Montero-Barrientos y col., 2007); la sobreexpresión del gen *nox1* que codifica una NADPH oxidasa en *T. harzianum* le confirió mayor actividad antagonista frente a fitopatógenos como *Pythium* (Montero-Barrientos y col., 2011); o la sobreexpresión en *T. harzianum*, carente de la ruta de trichotecenos, del gen que codifica la trichodieno sintasa (*tri5*) de *T. arundinaceum*, modificó su capacidad antagonista y las respuestas de la planta durante su interacción con ella (Malmierca y col., 2014b).

En *T. harzianum*, la estrategia de silenciamiento ha permitido asignar función a genes que participan en la ruta de terpenos y, a su vez, relacionarlos con el biocontrol

(Cardoza y col., 2006b y 2007). También se han silenciado genes de respuesta a estrés como *Thhog1*, que está implicado en la respuesta hiperosmótica y en la interacción con hongos fitopatógenos (Delgado-Jarana y col., 2006) o genes relacionados con la colonización de rizosfera y la inducción de defensas en planta como *Thpg1* (Morán-Diez y col., 2009).

El silenciamiento génico mediado por ARN es un mecanismo regulador que suprime, a nivel post-transcripcional, la expresión de un gen por especificidad de secuencia (Figura 6). Este sistema está descrito en diferentes clases de organismos eucariotas desde hongos hasta plantas o animales. Cabe destacar que Andrew Z. Fire y Craig C. Mello, en 2006, recibieron el Premio Nobel de Fisiología/Medicina por sus trabajos con ARNs de interferencia (siRNA), utilizados para estudiar la regulación en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire y col., 1998).



**Figura 6.** Esquema general del mecanismo de silenciamiento. A) Ejemplo de un ARN de interferencia (siRNA), que incluye ARN de doble cadena con 19 nucleótidos apareados y 2 no apareados, extremo 5' fosforilado y 3' no fosforilado, producto de escisión de la ARNasa III. B) Ruta de los siRNA. Los ARN de doble cadena largos (dsRNA) son cortados por la enzima DICER, miembro de la familia de la ARNasa III y convertidos en siRNA en una reacción dependiente de ATP, y éstos, se incorporan en el complejo de silenciamiento de ARN (RISC). Una vez producida la activación de RISC, la cadena antisentido del siRNA dirige la actividad endonucleasa de RISC al ARNm que posee la secuencia complementaria a la de esta cadena, lo que resulta en la escisión del ARNm diana. C) Ruta de micro ARNs (miRNA). DICER puede escindir moléculas de hasta 70 nucleótidos, precursoras de horquillas para la formación de miRNA de aproximadamente 22 nucleótidos. A diferencia de siRNAs, los miRNAs son de cadenas sencillas y se incorporan en el complejo de proteína miRNP, que les permite reconocer la cadena complementaria de ARNm para inhibir su traducción.

El mecanismo de silenciamiento se basa en los ARNs producidos por transgenes o transposones, que son reconocidos por la maquinaria de silenciamiento y desencadenan la respuesta (Figura 6). Una ARN-polimerasa dependiente de ARN es la enzima que reconoce estos ARNs y los convierte en ARNs bicatenarios. Éstos son procesados por una endonucleasa del tipo RNasa III (*Dicer*) en una reacción dependiente de ATP para generar moléculas bicatenarias cortas de ARN, denominadas siRNA, que contienen tanto la cadena sentido como la antisentido de la molécula bicatenaria original. Los siRNA, que presentan una longitud variable según el organismo, suelen tener entre 21 y 25 nucleótidos. Estos ARNs pequeños se incorporan en un complejo de RNasa multicomponente denominado *RNA-inducing silencing complex* (RISC) y sirven como moléculas “guía” que conducen a la degradación endonucleolítica del ARNm homólogo (Agrawal y col., 2003).

En *Trichoderma*, la estrategia de silenciamiento ha permitido caracterizar algunos genes de la ruta biosintética de terpenos y asignarles un papel en el antagonismo frente a patógenos y/o en las respuesta defensivas de la planta durante su interacción con ellos (Cardoza y col., 2006a; Cardoza y col., 2007; Malmierca y col., 2012). También por silenciamiento génico, *Thhog1* se ha implicado en la respuesta hiperosmótica de *T. harzianum* y en su antagonismo frente a hongos fitopatógenos (Delgado-Jarana y col., 2006), *Thpg1* en el proceso de colonización y la inducción de respuestas de defensa de *T. harzianum* en plantas (Morán-Diez y col., 2009), y *TvDim1* en la resistencia de *T. virens* a estreses oxidativos (Morán-Diez y col., 2010).





## **OBJETIVOS**

---



Esta tesis doctoral se enmarca dentro del subproyecto MINECO (AGL2012-40041-C02-01) titulado “Tirosol como molécula autorreguladora en *Trichoderma* y señalizadora en la interacción *Trichoderma*-tomate”. El tirosol es un compuesto fenólico que se produce en la ruta del shikimato, una ruta metabólica que no está completamente caracterizada en hongos. *T. parareesei* se ha descrito recientemente como una nueva especie que contiene cepas superproductoras de celulasas aisladas del suelo que anteriormente se englobaban en *T. reesei*, la especie filogenéticamente más próxima, por tanto, existe poca información sobre sus propiedades antagonista y sus interacciones con la planta. El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la ruta del shikimato en *T. parareesei* y su papel en las propiedades antagonistas del hongo y en sus efectos sobre la planta. A continuación se detallan los objetivos específicos del mismo:

1. Aislar el gen que codifica la corismato mutasa en *T. parareesei* T6, *Tpcm1*, y analizar *in silico* la proteína TPCM1 que codifica.
2. Analizar la expresión del gen *Tpcm1* en *T. parareesei* T6, bajo diferentes condiciones de cultivo del hongo.
3. Obtener y caracterizar molecularmente transformantes silenciados en el gen *Tpcm1* de *T. parareesei* T6.
4. Analizar cómo la producción de metabolitos de la ruta del shikimato afecta al crecimiento y a las propiedades antagonistas de este hongo.
5. Analizar, en interacciones *T. parareesei*-tomate, cómo metabolitos de la ruta del shikimato del hongo afectan las respuestas defensivas de la planta frente a patógenos y frente a un estrés salino.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1. ORGANISMOS UTILIZADOS

### 1.1. Bacterias

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : cepa utilizada para la transformación y clonación de ADN plasmídico mediante choque térmico (Hanahan, 1983). Destaca por su alta eficacia de transformación, llegando hasta  $5 \times 10^8$  transformantes por cada  $\mu\text{g}$  de ADN. Además, posee una delección en el gen Z del operón *lac*, que permite seleccionar por color las células transformadas que portan el plásmido.

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* pv. *tomato* DC3118 *cor-* (deficiente en coronatina), referidas a lo largo de esta memoria como Pst3000 y Pst3118, respectivamente. Ambas cepas fueron proporcionadas por el Dr. Roberto Solano del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC (Madrid) y utilizadas en los ensayos de fitopatogenidad en tomate.

### 1.2. Cepas de *Trichoderma*

Las cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla 1. *T. parareesei* IMI 113135 es la cepa silvestre incluida en todos los ensayos y que, a partir de este momento, la referiremos como cepa T6.

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

Especie	Cepa*	Origen geográfico
<i>T. atroviride</i>	IMI 352941	Francia
<i>T. brevicompactum</i>	IBT 40841	Irán
<i>T. harzianum</i>	CECT 2413	EE.UU.
<i>T. parareesei</i>	IMI 113135	desconocido

\*IMI: *International Mycological Institute*, IBT: Colección del *Department of Biotechnology* de la *Technical University of Denmark*, CABI Bioscience, Egham, Reino Unido, CECT: Colección Española de Cultivo Tipo, Burjassot, Valencia, España.

### 1.3. Hongos y oomicetos fitopatógenos

Los microorganismos fitopatógenos utilizados en este trabajo fueron: *Botrytis cinerea* B05.10, aislada de un campo de vid, utilizada como patógeno modelo por varios grupos de investigación y con el genoma secuenciado, *Fusarium oxysporum* CECT 2866, *Rhizoctonia solani* cepa 19, aislada de tomate, y la cepa 8 del oomiceto *Pythium ultimum*. Las dos últimas fueron proporcionadas por el Dr. Matteo Lorito de la Universidad Federico II de Nápoles (Italia).

## 1.4. Material vegetal

En los ensayos de planta se utilizó *Solanum lycopersicum* var. Marmande raf (Semillas Batlle S.A., Barcelona, España). Se trata de una variedad de tomate seleccionada artificialmente en Almería por su precocidad y que posee cierta tolerancia a la salinidad. El nombre de raf hace referencia a las siglas de “resistente a *Fusarium*” (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*).

## 2. VECTORES UTILIZADOS

**pGEM-T<sup>®</sup> Easy** (Promega, 3015 pb). Plásmido utilizado para clonar productos de PCR que presenta las siguientes características: deriva del vector pGEM<sup>®</sup>-5Zf(+) digerido con *EcoRV* y al que se ha añadido dos residuos de timina en los extremos 3’, esto permite la clonación de productos de PCR generados por polimerasas que añadan un nucleótido adenina en los extremos 3’; contiene un sitio de clonación múltiple dentro de la región codificante de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, lo que permite identificar los clones recombinantes por el color y por su resistencia a la ampicilina (Figura 7); y posee un origen de replicación monocatenario del fago f1.

**pSIL** (Sousa, 2004) (5280 pb). Plásmido utilizado como intermediario en el silenciamiento génico de la expresión del gen *Tpcm1* de *T. parareesei* T6. Se construyó mediante la clonación de diferentes fragmentos en el vector pBluescript SK(+). Contiene el promotor del gen *ta* de *T. harzianum* CECT2413, un fragmento de 159 pb correspondiente a uno de los intrones de la secuencia genómica de dicha cepa y el terminador del gen de la celobiohidrolasa 2 (*cbh2*) de *T. reesei* T59 (Figura 7). Permite la identificación de clones transformantes por resistencia a ampicilina.

**pJL43b1** (Gutiérrez y col., 1997) (4488 pb). Plásmido utilizado para la transformación de protoplastos de *T. parareesei* T6. Contiene el promotor del gen de la gliceraldehido 3-P-deshidrogenasa A (*gpdA*) de *A. nidulans*, el terminador del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (*cyc1*) de *S. cerevisiae* y el gen de resistencia a fleomicina (*ble*) de *Streptoalloteichus hindustanus* (Figura 7).

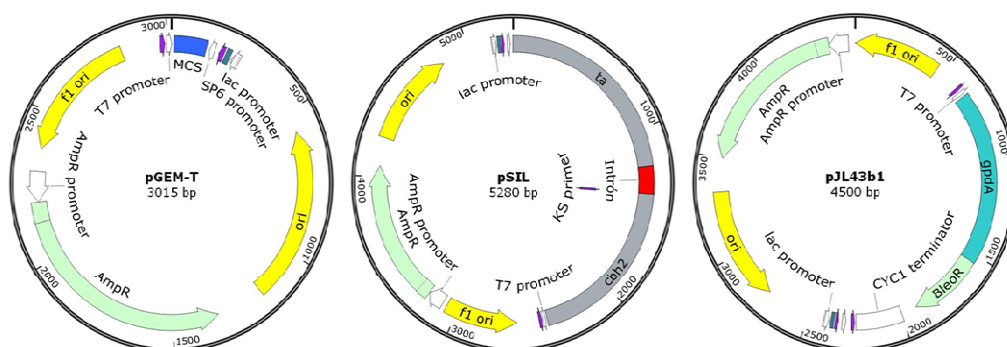


Figura 7. Esquema de los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo.



### 3. MEDIOS DE CULTIVO

Salvo que expresamente se indique otro método, los medios de cultivo 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 de cultivo general para el crecimiento *E. coli*.

Composición	Cantidad
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1 L

Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 1 M. Para su utilización como medio sólido se añadieron 15 g de agar por litro de medio.

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

**Medio SOB**, se empleó como un medio base para la preparación de células competentes de *E. coli*.

Composición	Cantidad
Tripton	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1 L

Se ajustó el pH a 7,0 y una vez autoclavado y frío se añadieron 10 mL de KCl 250 mM y 5 mL de MgCl<sub>2</sub> 2 M, previamente filtroesterilizados.

**Medio SOC**, se empleó como medio general para la preparación de células competentes de *E. coli*. Por cada litro de medio base (SOB) se le añadieron 9,2 mL de una solución de glucosa al 40% previamente filtroesterilizada.

**Medio King B (KB)** (King y col., 1954). Se empleó como medio de cultivo general para el crecimiento y mantenimiento de *P. syringae*.

Composición	Cantidad/Volumen
Proteosa Peptona	20 g
Glicerol	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1 L

Se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 1 M. Para su utilización como medio sólido se añadieron 15 g de agar (*European Bacteriological Agar*, Conda) por litro. Y, una vez esterilizado en autoclave, se añadieron rifampicina (50 µg/mL), para el cultivo de la cepa Pst3000 o rifampicina (50 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y espectinomicina (50 µg/mL), para la cepa Pst3118. Los tres antibióticos son de la casa comercial Sigma-Aldrich.

### 3.2. Medios de cultivo para hongos

**Medio Patata Dextrosa (*Potato Dextrose Broth*, PDB)**. Se empleó como medio de cultivo líquido general para el crecimiento de hongos. Este medio fue adquirido a Difco, que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 24 g en un litro de agua destilada.

**Medio PDA**. Se empleó como medio de cultivo sólido general para el crecimiento de hongos. Este medio fue adquirido a Sigma-Aldrich, que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 39 g en un litro de agua destilada.

**Medio Puré Patata Glucosa (PPG)** (Sousa, 2004). Es un medio que se suplementa con agar y se utiliza como alternativo del PDA para el crecimiento y la esporulación de *Trichoderma*.

Composición	Cantidad
Puré de patata (Maggi <sup>®</sup> )	20 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1 L

**Medio Mínimo (MM)** (Penttilä y col., 1987). Medio líquido utilizado para el crecimiento de *Trichoderma* en los estudios de expresión génica. También se utilizó, como medio sólido, en estudios de crecimiento fúngico, suplementándolo con 15 g de agar por cada litro de medio.

Composición	Cantidad/Volumen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15g
Glucosa	20 g
Metales trazas (1000X)*	1 mL
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1 L

**\*Metales traza (1000X)**

Composición	Cantidad
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,6 g
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,4 g
CoCl <sub>2</sub>	2 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1 L

Una vez ajustado el pH a 5,5 con KOH y esterilizado en autoclave se añadieron: 20 mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 mg/mL (esterilizado en autoclave), 4,1 mL de CaCl<sub>2</sub> 1 M (esterilizado por filtración) y 2,4 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M (esterilizado por filtración).

**Medio CM.** Empleado como medio líquido de crecimiento de *Trichoderma* para obtención de protoplastos.

Composición	Cantidad
Extracto de malta (Difco)	5 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	5 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1 L

**Medio Tryptic Soy Agar (TSA).** Este medio se utilizó en la selección de transformantes de *Trichoderma*. Se añadieron 30 g/L de *tryptic soy broth* (TSB, Merk) y

15 g/L de agar técnico (Difco). Para regenerar los protoplastos se añadió sorbitol 1 M (USB). Este medio se suplementó, cuando fue necesario, con fleomicina (100 µg/mL) para la selección de transformantes.

**Medio Malt Extract Agar (MEA).** Se empleó como medio sólido general para el cultivo y mantenimiento de *B. cinerea*.

Composición	Cantidad
Peptona micológica (Thermo Scientific)	10 g
Extracto de malta (Difco)	20 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p. 1 L	

**Medio agar-agua (AA).** Es un medio de cultivo nutricionalmente pobre y ocasiona un desarrollo lento del hongo. Fue empleado en la obtención de cultivos monospóricos. Se preparó a una concentración de agar del 1%.

### 3.3. Medios de cultivo para planta

**Medio Murashige-Skoog (MS)** (Murashige y Skoog, 1962). Medio de cultivo general para el crecimiento de plantas de tomate.

Composición	Cantidad
Medio MS (Duchefa Biochemie)	4,9 g
Sacarosa	10 g
Agar Bacteriológico Americano (Conda)	8 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p. 1 L	

## 4. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS

### 4.1. Cultivo y mantenimiento de bacterias

Los cultivos bacterianos se crecieron, en sus medios correspondientes, a 28 (Pst) o 37°C (*E. coli*) y 250 rpm durante 12-14 horas. Las bacterias se mantuvieron durante cortos periodos de tiempo en placas Petri, selladas con Parafilm<sup>®</sup>, a 4°C. Para periodos más largos de tiempo, se prepararon suspensiones de las mismas en glicerol al 15% (v/v), y se conservaron a -80°C.

## 4.2. Cultivo de hongos

### 4.2.1. Obtención y recogida de esporas

Para la obtención de esporas, *Trichoderma* se cultivó en medio PDA a 25-30°C durante 5-7 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. A continuación, se filtró la suspensión de esporas a través de lana de vidrio para eliminar restos de micelio. Las esporas se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

Las esporas de *B. cinerea* se recogieron de forma similar a como se ha descrito para *Trichoderma*, a partir de cultivos en medio MEA.

### 4.2.2. Cultivo para la obtención de germínulas de *T. parareesei*

Para la obtención de germínulas (esporas pregerminadas que sólo han desarrollado el tubo germinativo), se inocularon  $10^6$  esporas/mL de cepas de *T. parareesei* en medio PDB y se incubaron a 28°C y 180 rpm durante 12-15 horas. Las germínulas se recogieron por centrifugación a 3750 rpm durante 10 minutos a 4°C, se lavaron mediante tres centrifugaciones consecutivas con agua destilada estéril, se resuspendieron en 3 mL de agua destilada estéril y se cuantificaron, con una cámara Thoma, para ser utilizadas de forma inmediata.

### 4.2.3. Cultivo para la obtención de sobrenadante de *T. parareesei*

Se utilizaron matraces de 250 mL conteniendo 100 mL de PDB o de MM-glucosa al 2%, inoculados con esporas de *T. parareesei* a una concentración final de  $10^6$  esporas/mL, que se incubaron a 30°C y 200 rpm durante 24 o 48 horas (según el requerimiento). Pasado este tiempo, los sobrenadantes se recogieron por filtración a través de papel filtro, ayudándonos de una bomba de vacío, se filtroesterilizaron a través de filtros de 0,22 µm (MILLEX®GV) y se mantuvo a -20°C hasta su uso. También se recogieron y filtraron sobrenadantes de *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. brevicompactum* y *T. parareesei* T6 procedentes de cultivos de cada uno de estos hongos en medio PDB, incubados como se describe antes pero durante 5 días. Estos sobrenadantes se saturaron con un volumen equivalente de acetona al 100% y se conservaron en frío hasta su uso.

### 4.2.4. Cultivos para la obtención de proteínas intracelulares

Se utilizaron matraces de 250 mL conteniendo 100 mL de PBD con paredes celulares de *R. solani* al 0,5% o MM-glucosa 2%, este último suplementado o no con 2 o 5 mM de Phe, Tyr o Trp, que se inocularon con esporas de *T. parareesei* a una concentración final de  $10^6$  esporas/mL, se incubaron a 28°C y 200 rpm durante 48 horas.

Pasado este tiempo, los micelios se recogieron por filtración a través de papel filtro y se lavaron con agua.

Los micelios para ensayos de actividades quitinasa, celulasa y proteasa, se congelaron con ayuda de nitrógeno líquido, se liofilizaron durante 16 horas, se pulverizaron y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

#### 4.2.5. Cultivo para la extracción de ADN de *T. parareesei*

Cuando se requirió biomasa para la extracción de ADN a gran escala, matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio PDB, se inocularon con una concentración final de  $10^6$  esporas/mL de *Trichoderma* y se incubaron a 28°C y 180 rpm durante 48 horas. La biomasa se recogió mediante filtración a través de papel filtro, se lavó 2-3 veces con agua destilada estéril, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó. El material liofilizado se conservó a -20°C hasta su utilización.

#### 4.2.6. Cultivo para el análisis de la expresión génica de *T. parareesei*

Cuando se requirió biomasa de *T. parareesei* para la extracción de ARN destinado a análisis de expresión génica, el cultivo se realizó en dos fases. En la primera fase (preinducción o producción de biomasa), se inocularon matraces de 250 o 1000 mL, según la cantidad de biomasa necesitada, que contenían 100 o 300 mL de PDB como se describe en el apartado 4.2.4. El micelio se recogió por filtración, como se describe en el apartado 4.2.4., y se utilizó para inocular los medios de inducción (2ª fase). Los medios de inducción se prepararon en 100 mL de medio MM (Penttilä y col., 1987), sin glucosa, suplementado con distintos compuestos según la condición de cultivo a ensayar: glucosa al 2%, denominado glucosa normal (Gn); glucosa al 0,5%, déficit de carbono (G0); nitrógeno normal (Nn), 20 mL/L de un stock de 250 mg/mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; déficit de nitrógeno (N0), 2 mL/L de un stock de 250 mg/mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; paredes celulares de *R. solani* al 1%, y material vegetal al 1%. Además se utilizaron como medios MM con glucosa al 2% y Tyr 2 o 5 mM, Phe 2 o 5 mM, o Trp 2 o 5 mM, los tres aminoácidos de la casa comercial Sigma-Aldrich. Los cultivos se crecieron durante 4, 8 o 24 horas a 28°C y 200 rpm. El micelio se recogió por filtración, como se describe en el apartado 4.2.4, y a continuación se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó durante 12 horas y se conservó a -20°C hasta su utilización.

#### 4.2.7. Cultivo para la obtención de pared celular de *R. solani*

El hongo se cultivó en PDB a 25°C y 150 rpm durante 4 días y, posteriormente, el matraz conteniendo el cultivo, se autoclavó. La obtención de paredes celulares de *R. solani* se detalla a continuación: la biomasa se recogió mediante una centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos, se lavó tres veces mediante centrifugaciones-resuspensiones en agua desionizada, y la biomasa seca se congeló con nitrógeno líquido

y se fraccionó con ayuda de un mortero. Los fragmentos se lavaron, tres veces, mediante centrifugaciones a 8000 rpm durante 10 min en una solución de NaCl al 2% (p/v). Posteriormente, se realizó tres lavados, mediante centrifugación en agua desionizada. Y, el material obtenido se congeló con nitrógeno líquido, se liofilizó durante 16 horas, se pulverizó, con ayuda de un mortero, y se conservó a temperatura ambiente.

#### 4.3. Mantenimiento de hongos

De manera general, el mantenimiento rutinario de las cepas fúngicas y del oomiceto en el laboratorio se llevó a cabo por resiembras periódicas en placas conteniendo medio PDA, excepto para *B. cinerea* que se utilizó medio MEA. Las placas se inocularon depositando, en el centro, un cilindro de agar de 0,5 cm de diámetro procedente de una zona de crecimiento activo de un cultivo anterior o 5-10 µl de una suspensión de esporas. La temperatura de incubación varió de 22 a 28°C según los requerimientos del hongo. Una vez que los cultivos habían crecido, las placas se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron a 4°C durante periodos inferiores a un mes.

#### 4.4. Crecimiento de tomate

Las semillas de tomate *S. lycopersicum* se desinfectaron mediante agitación durante 10 minutos en una solución de etanol al 70% (v/v) y descartando el sobrenadante. Seguidamente se lavaron por agitación durante 10 minutos en una solución de lejía al 50% (v/v), se retiró el sobrenadante y se lavaron, 3 veces, con agua destilada estéril. Las semillas se incubaron a 4°C entre 24 y 48 horas para sincronizar la germinación e inmediatamente se utilizaron.

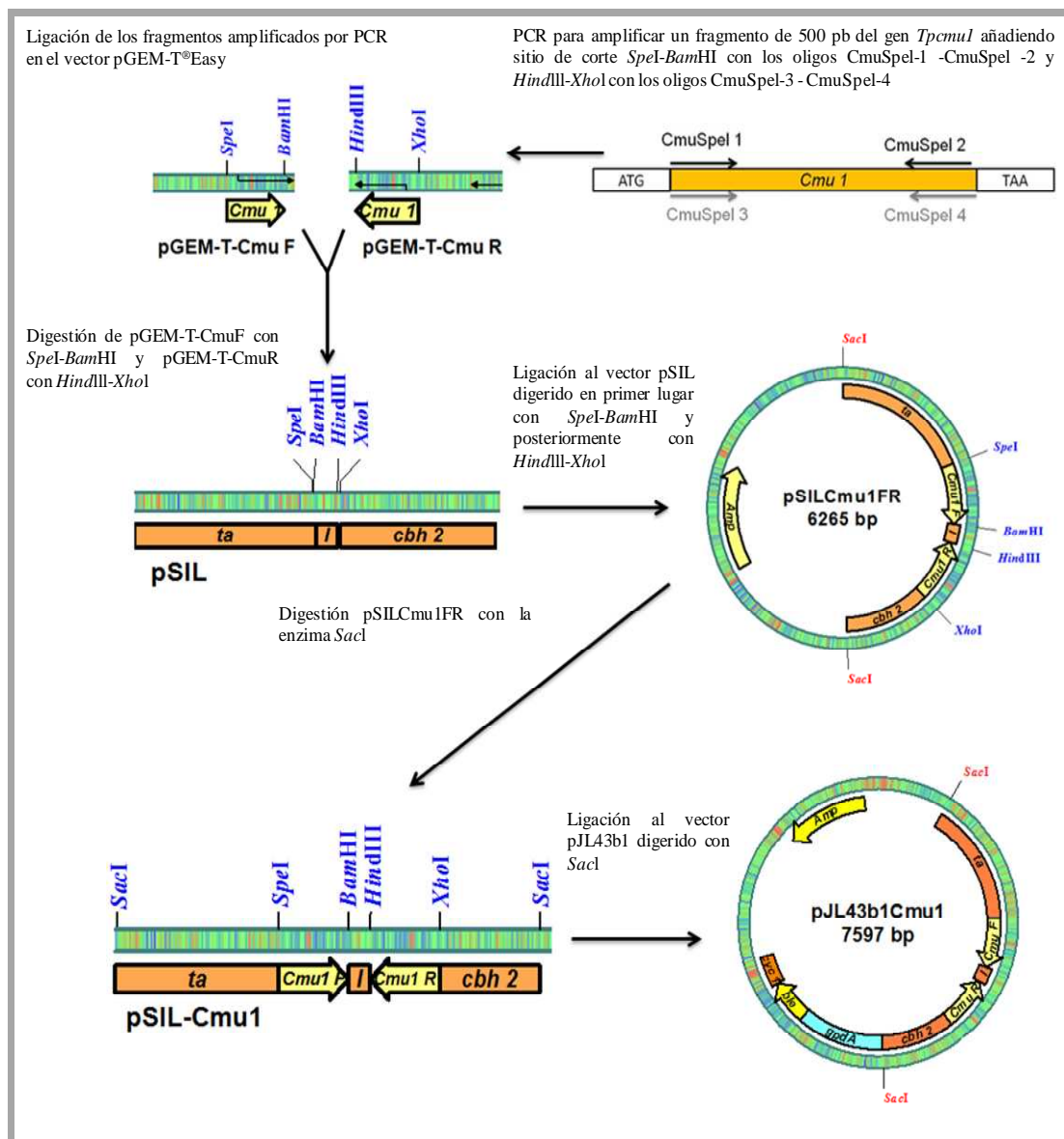
Para los ensayos *in vitro*, salvo que se indique lo contrario en el texto, las semillas de tomate fueron cultivadas en placas Petri o en cajas *Phytatray* (Sigma-Aldrich) conteniendo medio MS o MM-glucosa al 2% (p/v), que se mantuvieron, un tiempo variable según el ensayo, en un fitotrón (Radiber) programado a 24°C, 40% de humedad relativa y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Para los ensayos *in vivo*, las semillas se colocaron en macetas de 6x6x9 cm contenido un sustrato estéril, mezcla de turba:vermiculita 50:50, y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, temperatura oscilante entre 20 y 27°C y riego según necesidad.

### 5. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

El vector pJL43b1-Cmu1 se construyó a partir del vector pSIL mediante la inserción de un fragmento de 500 pb del gen *Tpcm1* de *T. parareesei* T6, en

orientaciones invertidas (Sousa, 2004). Ambos fragmentos se amplificaron en dos reacciones de PCR a partir del ORF del gen *Tpcm1* con los oligonucleótidos CmuSpe1 1 y CmuSpe1 2, para el fragmento *forward*, y CmuSpe1 3 y CmuSpe1 4, para el fragmento *reverse*, que incluían en su secuencia las dianas para las enzimas *SpeI/BamHI* y *XhoI/HindIII*, respectivamente. Los dos fragmentos amplificados por PCR se subclonaron en dos pasos sucesivos en el vector pSIL, previamente digerido con las enzimas correspondientes, dando lugar al plásmido pSIL-Cmu1. Este plásmido se digirió con *SacI*, liberando el *cassette* formado por el promotor del gen *ta* de *T. harzianum* CECT 2413, un primer fragmento de 500 pb del gen *Tpcm1*, un fragmento de 159 pb correspondiente a un intrón de una secuencia genómica de *T. harzianum* CECT 2413, un segundo fragmento de 500 pb del gen *Tpcm1* (en orientación invertida respecto al primero) y el terminador del gen *cbh2* de *T. reesei* (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de la construcción del vector pJL43b1-Cmu1. *Amp*: gen que confiere resistencia a ampicilina; *ble*: gen que confiere resistencia a fleomicina.



Los dos fragmentos amplificados con las secuencias dianas fueron subclonados en el vector pGEMT-Easy dando lugar a los plásmidos pGEMT-Cmu F y pGEMT-Cmu R, como paso previo a la construcción del vector pSIL-Cmu1, para así aumentar el porcentaje de éxito en el proceso de ligación de los fragmentos al plásmido pSIL.

## 6. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

### 6.1. Transformación de *E. coli*

#### 6.1.1. Preparación de células competentes

El protocolo utilizado para la preparación de células competentes está basado en el método de Inoue y col. (1990):

1. Se realizó una siembra en estría en medio LB agar de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se incubó a 37°C durante 16 horas.
2. De esta placa inicial se inocularon 5 colonias aisladas en un matraz de 2 L con 250 mL de medio SOC y se incubó durante 20 horas, aproximadamente, a 25°C y 200 rpm, hasta alcanzar una D.O. de 0,6 unidades a 600 nm.
3. El cultivo se mantuvo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
4. El precipitado se resuspendió en 40 mL de tampón TB frío y se mantuvo en hielo durante 10 minutos.
5. Se centrifugó nuevamente, en las mismas condiciones, y las células se resuspendieron en 20 mL de tampón TB frío.
6. Se añadieron 1,4 mL de DMSO (concentración final al 7%) y se mantuvo en hielo durante 10 minutos.
7. Se prepararon alícuotas, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

**Tampón TB:** PIPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM. Se ajustó el pH a 6,7 con KOH, se añadió MnCl<sub>2</sub>, se filtró y se conservó a 4°C.

#### 6.1.2. Transformación de células DH5 $\alpha$

La transformación de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  se realizó mediante “choque térmico”, siguiendo el método descrito por Hanahan (1983) y modificado por Inoue y col. (1990). El protocolo de transformación se detalla a continuación:

1. Descongelar las células competentes en hielo (10-15 minutos).
2. Mezclar 60  $\mu$ L de células competentes con 10  $\mu$ L de ADN de interés.
3. Someter a un choque térmico (37°C durante 2 minutos) y mantener la muestra en hielo durante 2 minutos.

4. Añadir 500  $\mu$ L de medio LB e incubar a 37°C y 150 rpm durante 55-60 minutos.
5. Sembrar en placas Petri conteniendo LB agar, con ampicilina, IPTG y X-GAL a la concentración descrita en el apartado 3.1. Las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche (16-20 horas).

## 6.2. Transformación de *T. parareesei*

La transformación de *T. parareesei* se realizó mediante protoplastos siguiendo el método descrito por Penttilä y col. (1987) y optimizado por Cardoza y col. (2006a). El gen *ble* se empleó como marcador de selección de los transformantes.

### 6.2.1. Preparación de protoplastos

1. Esporas de *T. parareesei* fueron inoculadas en medio PPG y las placas se incubaron a 28°C hasta obtener un cultivo muy esporulado. Se recogieron las esporas (apartado 4.4.1) y se inocularon 100 mL de medio CM, con una cantidad total de  $1,77 \times 10^9$  esporas.
2. El cultivo se incubó durante 17 horas a 28°C y 250 rpm, condición que mantiene el micelio creciendo en forma laxa y con baja tendencia a formar precipitados.
3. El micelio se filtró a través de nylon (nytal) estéril de 30  $\mu$ m de diámetro de poro y se lavó con 100 mL de NaCl 0,9% (p/v) y con 100 mL de TLA.
4. Una vez lavado el micelio, se eliminó la humedad, pero sin secarlo por completo.
5. El micelio, 500 mg, se resuspendió en 50 mL del tampón de protoplastos TPA, conteniendo DTT 25 mM (preparado en el momento), y se incubó a 30°C y 250 rpm durante 1 hora.
6. Después se centrifugó a 3600 x g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El micelio se lavó mediante centrifugación a 3600 x g durante 10 minutos con 50 mL de TPA, para eliminar restos de DTT.
7. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 mL de TPA, conteniendo enzima lítica (Sigma), filtroesterilizada, a una concentración final de 5 mg/mL.
8. La digestión resultante, se pasó a un matraz y se incubó a 30°C y 80 rpm durante 2-3 horas, aproximadamente, controlando la formación de protoplastos al microscopio cada hora.
9. Una vez comprobada la presencia de protoplastos en cantidad adecuada, la digestión se filtró a través de nylon de 30  $\mu$ m de diámetro de poro, que retiene el micelio pero deja pasar los protoplastos.
10. Los protoplastos recuperados fueron diluidos en proporción 1:5 en solución ST y precipitados por centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos, y lavados posteriormente con una solución ST.
11. Los protoplastos se resuspendieron en aproximadamente 450  $\mu$ L de solución STC, se mantuvieron en hielo y se realizó un recuento de ellos. Entonces, la

concentración se ajustó a  $10^7$ - $10^8$  protoplastos/mL con STC y, finalmente, se añadió 1/10 del volumen de solución PTC.

**TLA:** tampón fosfato sódico 10 mM;  $MgSO_4$  0,6 M, pH 5,8. Se esterilizó en autoclave.

**TPA:** tampón fosfato sódico 10 mM;  $MgSO_4$  0,8 M, pH 5,8. Se esterilizó en autoclave.

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

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

**Solución PTC:** Tris-HCl 10 mM, pH 7,5;  $CaCl_2$  20 mM; PEG 6000 al 60%. Se esterilizó por filtración.

### 6.2.2. Transformación del hongo

En tubos situados en un baño de hielo se mezclaron de 2 a 5  $\mu$ g de ADN con 200  $\mu$ L de una solución de protoplastos (conteniendo una concentración  $10^7$ - $10^8$  protoplastos/mL). La mezcla se mantuvo en hielo durante 20 minutos. Se añadió 1 mL de solución PTC y los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después, se añadieron 1,2 mL de solución STC para diluir los protoplastos, se mezcló, y se sembraron alícuotas de 300  $\mu$ L en placas conteniendo 7 mL de agar de cobertura (TSA-*top*) sobre el medio selectivo (TSA con fleomicina 100  $\mu$ g/mL). Finalmente, las placas se dejaron solidificar durante 5 minutos y se incubaron a 30°C hasta que aparecieron las colonias (5-7 días).

#### 6.2.2.1. Selección de los transformantes

Una vez que las colonias habían crecido en el medio selectivo:

1. Se picó cada colonia con un palillo estéril y se sembró en medio TSA con fleomicina 200  $\mu$ g/mL (primer pase selectivo). Las placas se incubaron a 28°C durante 5-7 días.
2. Se realizó un resiembra, de una en una, en medio TSA, pero sin antibiótico (pase no selectivo), y se incubaron a 28°C durante 5-7 días.
3. Se repitió el primer paso (segundo pase selectivo).

## 7. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 7.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña y mediana escala

Para la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala (*Miniprep*) se utilizó el protocolo de purificación de ADN plasmídico proporcionado por la casa comercial (Macherey-Nagel), y se partió de 1 a 5 mL de cultivo bacteriano. Para la extracción a mediana escala, se utilizó el kit “*GeneJet Plasmid Midiprep*” (Thermo Scientific), se partió de 50 mL de cultivo y se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

### 7.1.1. Extracción rápida de ADN plasmídico de bacterias transformadas

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

1. Se inocularon con una colonia de bacteria 3 mL de LB, suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 16 horas, para permitir el crecimiento de la bacteria.
2. Se recogieron, por centrifugación a 13000 x g, las células presentes en 700  $\mu\text{L}$  de cultivo y se descartó el sobrenadante.
3. La muestra se hirvió durante 30 segundos y, posteriormente, se centrifugó a 13000 x g durante 10 minutos.
4. El precipitado de la muestra se retiró con un palillo estéril, impregnado de una solución de ARNasa 10 mg/mL (Ribonucleasa A, Sigma).
5. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol y el ADN plasmídico se recogió mediante centrifugación a 13000 x g durante 10 minutos.
6. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó, mediante centrifugación 13000 x g durante 5 minutos, con etanol al 70% (v/v).
7. Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 20-25 mL de agua estéril o de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) 10:1.

### 7.2. **Extracción de ADN genómico de *Trichoderma***

La extracción de ADN genómico de *Trichoderma* se realizó siguiendo diferentes protocolos según el ensayo al que fuera destinado, por calidad o por cantidad.

#### 7.2.1. Extracción a pequeña escala

La extracción de ADN genómico a pequeña escala se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Raeder y Broda (1985), con ligeras modificaciones que se detallan a continuación:

1. Se partió de 40 mg de micelio, previamente pulverizado, se le añadieron 500  $\mu\text{L}$  del tampón de lisis y se homogenizó la mezcla con una punta de micropipeta cortada.
2. A continuación, se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de fenol saturado con tampón TE 10:1 y 250  $\mu\text{L}$  de cloroformo isoamílico (CIA) 24:1.
3. Se mezcló cuidadosamente la muestra, y se centrifugó a 13000 x g y 4°C durante 50 minutos.

4. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de una solución de 10 mg/mL de ARNasa y se incubó a 37°C durante 30 minutos, con objeto de eliminar el ARN presente en la muestra.
5. Se añadió un volumen equivalente de CIA 24:1, se mezclaron delicadamente ambas fases y se centrifugó a 13000 x g y 4°C durante 10 minutos.
6. De nuevo, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, se añadieron 1/10 parte de acetato sódico 3 M pH 5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, y la el tubo se mantuvo al menos, 2 horas a -20°C.
7. El precipitado se recogió por centrifugación a 13000 x g y durante 10 minutos a 4°C, se lavó mediante centrifugación con etanol al 70%, con objeto de eliminar las sales, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de tampón TE 10:1.

**Tampón de lisis:** Tris-HCl 200 mM, pH8,5; NaCl 250 mM; EDTA, 25 mM y SDS al 0,5%, este último añadido tras autoclavar el tampón y en el momento de su utilización.

### 7.2.2. Extracción rápida

En algunas ocasiones fue necesario extraer ADN genómico de muchos cultivos simultáneamente para, por ejemplo realizar experimentos de PCR. Para evitar el tedioso proceso que se describe en el apartado 7.2.1, se siguió el protocolo el siguiente protocolo (van Zeijl y col., 1998):

1. Con un palillo estéril se inocularon esporas en un tubo *ependorf* conteniendo 200  $\mu\text{L}$  de PDB y se incubaron a 30°C y 200 rpm durante 48 horas.
2. El micelio obtenido se recogió con un palillo estéril y se transfirió a un tubo limpio que contenía 50  $\mu\text{L}$  del tampón KC y 2,5 mg/mL de Novozyme 234 (InterSpex Products, Inc.), y se incubó a 37°C durante una hora.
3. Posteriormente, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de tampón de dilución y se incubaron a 95°C durante 3 minutos.
4. Finalmente, los tubos se mantuvieron en un baño de hielo durante, al menos, 5 minutos, para permitir que los restos de micelio decantaran.
5. Para las reacciones de PCR, se emplearon como molde 1  $\mu\text{L}$  del sobrenadante presente en los tubos.

**Tampón KC:** KCl 0,8 M, ácido cítrico 10 mM, ajustar el pH a 6,6 antes de agregar la enzima Novozyme, esterilizada por filtración, y mantener a 4°C.

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

### 7.2.3. Extracción a mayor escala

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

1. Se depositaron 120 mg de micelio, liofilizado y pulverizado previamente, en un tubo de 10 mL, se añadieron 2,5 mL de fenol, 2,5 mL de tampón de lisis y 2,5 mL de CIA 24:1, en este orden, y la muestra se homogenizó mediante agitación en un *vortex*.
2. La muestra se incubó a 50°C durante 30 minutos, con agitación manual cada 5 minutos, se centrifugó a 1900 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio.
3. Se realizaron dos nuevas extracciones con fenol:CIA 24:1 (1/2 de volumen de cada uno) y una extracción final con CIA 24:1. Los tubos se centrifugaron siempre a 1900 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. El ADN se precipitó añadiendo 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, y se mantuvo la muestra a -20°C durante al menos 2 horas.
5. El precipitado se recogió por centrifugación a 1900 x g durante 20 minutos a 4°C, y se retiró el sobrenadante.
6. El precipitado se lavó mediante centrifugación a temperatura ambiente con etanol al 70%, y se eliminó el sobrenadante de lavado.
7. Finalmente, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 500 µL de tampón TE 10:1.

**Tampón de lisis:** Tris-HCl 200 mM, pH8,0; EDTA, 100 mM y SDS al 1%, este último añadido tras autoclavar el tampón y en el momento de su utilización.

### 7.3. Extracción de ADN de interacciones tomate-*Trichoderma*

Este protocolo se utilizó para obtener ADN de raíces de tomate procedentes de ensayos donde se evaluaba su colonización por las diferentes cepas de *T. parareesei*. Se recogieron raíces de cultivos, inoculados 48 horas antes con germímulas del hongo, se lavaron por agitación en agua destilada estéril para eliminar resto de hongo presente en la superficie de la raíz, se secaron sobre papel estéril y se rompieron en presencia de nitrógeno líquido. Posteriormente, se empleó este protocolo para extraer el ADEN:

1. Se depositaron 50-100 mg de raíz pulverizada en un tubo *eppendorf* y se añadieron 600 µL de tampón CTAB 2%, la mezcla se homogenizó por agitación durante 15 segundos en un agitador Silamat® S5.
2. La mezcla se incubó a 65°C durante 40 minutos, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos y se recogieron 400 µL de sobrenadante, que se transfirieron a un tubo limpio.
3. Se añadieron 600 µL de cloroformo al tubo, se mezcló por agitación en un *vortex* y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos.

4. Se transfirieron 300  $\mu$ L de fase acuosa a un tubo limpio y se añadieron 1,5 volúmenes de isopropanol. La muestra se mezcló por agitación en *vortex* y se mantuvo 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
5. El ADN se recogió por centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos y se descartó el sobrenadante.
6. El precipitado se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70% por centrifugación a 7500 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante.
7. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua estéril y se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

**Tampón CTAB:** Tris-HCl 100 mM, pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2%, y tras esterilizar en autoclave, se añade un 0,2% de mercaptoetanol en el momento de su uso.

#### 7.4. Extracción de ARN

Con el fin de reducir el riesgo de degradación de ARNs por acción de las ARNasas, todas las soluciones se prepararon con agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC, Sigma) al 0,1% (v/v), durante 3 horas y, posteriormente, autoclavada. Además se empleó material de vidrio esterilizado por calor seco y lotes de material de plástico nuevos y estériles. Para llevar a cabo la extracción de ARN, tanto de material fúngico como de material vegetal, se utilizó el método del TRIZOL<sup>®</sup> (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se depositaron aproximadamente 30 mg de material, previamente pulverizado, en un tubo *ependorf* y se añadieron 1 mL del reactivo TRIZOL<sup>®</sup>.
2. La muestra se homogenizó por agitación durante 15 segundos en un agitador Silamat<sup>®</sup> S5 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. Se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó en un *vortex* durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos.
4. Seguidamente la muestra se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , con el fin de eliminar los restos celulares. Y, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, se le añadieron 500  $\mu$ L de isopropanol y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la precipitación del ARN.
5. A continuación, se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , para recoger el ARN y se descartó el sobrenadante.
6. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol-DEPC al 70%, agitando en *vortex*, y se recogieron mediante centrifugación a 7500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante y dejando secar el precipitado al aire.
7. Se añadieron 30-50  $\mu$ L de agua-DEPC, el tubo se incubó 10 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$  para favorecer la resuspensión del ARN, y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 8. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 8.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de los ácidos nucleicos de las preparaciones se determinó espectrofotométricamente en un equipo NanoDrop Spectrophotometer<sup>®</sup> ND-1000 (Thermo Scientific) y utilizando como blanco el solvente (agua o TE 10:1) en el que estuvieran resuspendidos. La cantidad de ácidos nucleicos se calculó considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/mL, para ADN, y 40 µg/mL, para ARN (Sambrook y Russell, 2001).

La calidad de las preparaciones así como la bondad de las cuantificaciones se comprobaron siempre en geles de agarosa no desnaturalizantes usando marcadores moleculares de ADN de concentración conocida.

### 8.2. Manipulación enzimática de ADN

#### 8.2.1. Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción se utilizaron siguiendo las indicaciones del proveedor (Thermo Scientific, Roche) ya que cada una de ellas tiene unas condiciones óptimas de digestión en cuanto a la concentración de sales, la temperatura y el tiempo de incubación. Como norma general, el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la digestión debido a la alta concentración de glicerol en las soluciones empleadas para su almacenamiento. Asimismo, es conveniente que el ADN esté suficientemente diluido y limpio, con el fin de no alterar las condiciones de reacción. Pasos que se siguieron:

1. Se mezclaron en un tubo 1/10 del volumen total de digestión de tampón de digestión 10X, la cantidad adecuada de ADN resuspendida en agua o en tampón TE 10:1, las unidades que se consideraron necesarias de enzima y agua destilada hasta completar el volumen de reacción.
2. La mezcla se incubó a temperatura adecuada (normalmente 37°C) durante 3-7 horas.
3. La digestión se inactivó incubando la mezcla a 65-70°C durante 5-15 minutos.

#### 8.2.2. Fenolización de ADN plasmídico

La eliminación de impurezas presentes (proteína o resto de enzimas) en muestras de ADN plasmídico se realizó mediante fenolización. Este proceso se realizó, particularmente, cuando el ADN plasmídico procedía de un tratamiento enzimático. El proceso constó de los siguientes pasos:



1. Inicialmente, se diluyó la muestra con agua destilada estéril, para disponer un mayor volumen sobre el que realizar los siguientes pasos, (por ejemplo, hasta 200  $\mu\text{L}$ ).
2. Se añadió un volumen equivalente de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en un *vortex* y las fases se separaron por centrifugación a 13200 rpm durante 5 minutos.
3. El ADN se precipitó añadiendo 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, y manteniendo la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos 30 minutos.
4. El precipitado se recogió por centrifugación a 13200 rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se retiró el sobrenadante.
5. El precipitado se lavó, como se describe en el apartado 7.2.1 y se resuspendió en 20-50  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril.

### 8.2.3. Ligación de moléculas de ADN

Para ligación de extremos de moléculas de ADN mediante la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos fosfato 5' e hidroxilo 3', se utilizó la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo 2  $\mu\text{L}$  del tampón de ligasa 10X, proporcionado con la enzima, 1 unidad (U) de T4 ligasa y una relación molar entre inserto y vector de 3:1, incubando la reacción toda la noche (12-16 horas) a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## 8.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 8.3.1. Reacción de PCR clásica

Las reacciones de PCR convencionales se realizaron empleando *Taq* polimerasa (Biotools). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  conteniendo el ADN molde (la cantidad dependía de la concentración de partida), 5  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 10X (conteniendo  $\text{MgCl}_2$ ), 100  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 1,5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido y 2,5  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa.

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

#### 8.3.1.1. Marcaje no radiactivo de ADN

Se utilizó el *kit "PCR Dig Labeling Mix"* (Roche) que tiene una mezcla de dTNPs que llevan el dCTP marcado con digoxigenina, y se incorporan al ADN mediante una reacción de PCR. La mezcla de reacción es similar a la descrita en el apartado 8.3.1 pero utilizando, en una proporción 1:10 del volumen de reacción, los dNTPs del *kit* en lugar de dNTPs no marcados.

#### 8.3.2. RT-PCR

Para la síntesis del ADNc se utilizó el *kit "PrimerScript™"* (Takara), siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se mezclaron, en un tubo de microcentrífuga y por este orden, 5,5  $\mu\text{L}$  de, 2  $\mu\text{l}$  del tampón de reacción 5X, 0,5  $\mu\text{L}$  de oligo dT (5  $\mu\text{M}$ ) y 0,5  $\mu\text{L}$  del enzima.
2. Se añadieron 2-3  $\mu\text{g}$  de ARN y se completó la mezcla hasta un volumen de 10  $\mu\text{L}$  con agua libre de ARNasa.
3. Se incubó a 37°C durante 15 minutos (hibridación), 15 minutos a 42°C (síntesis del ADNc) y 30 segundos a 85°C, para inactivar la reacción por calor.
4. El tubo se mantuvo a -20°C hasta su uso.

#### 8.3.3. PCR a tiempo real (*Real-time* PCR)

Es una variante de la PCR convencional que permite, en un solo paso, la detección y cuantificación de ADN. En este trabajo se utilizó el colorante *SYBR Green* que emite fluorescencia cuando se une a los fragmentos que se van amplificando en una reacción de PCR.

Se utilizó el *kit "KAPA SYBR® FAST qPCR"* (Kapa Biosystems) y la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , siguiendo las instrucciones del proveedor: 6  $\mu\text{L}$  de la mezcla maestra KAPA SYBR® FAST 2X, 200 nM de oligonucleótido *forward*, 200 nM de oligonucleótido *reverse*, 2  $\mu\text{L}$  de ADNc (menos de 1 ng).

Las amplificaciones se realizaron, por triplicado, en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems) que se programó con las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 3 minutos a 60°C (anillamiento y extensión).

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de *Real-time* PCR fueron analizados mediante una curva de disociación para determinar posibles productos inespecíficos como la formación de dímeros.

Para calcular la expresión relativa, se utilizó el modelo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , 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). Con este método se comparan directamente los Cts del gen problema y del gen de referencia ( $\Delta Ct$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta Ct$  de la muestras experimental con respecto a la muestra control. Un Ct es el ciclo donde se encuentra una cantidad de ADN detectable, o sea que sobrepasa el umbral (*threshold*) de fluorescencia basal, en una muestra. En este trabajo los niveles de expresión génica se representan como el logaritmo en base 10 ( $\log_{10} 2^{-\Delta\Delta CT}$ ) y, para comparaciones, en las muestras control se da un valor de 0.

### 8.3.4. Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Sigma-Aldrich, y se recogen en las Tablas 2 y 3.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos usados cuando se empleó como molde ADN de *T. parareesei*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Aplicación
cmuF	ATGGATTCAGCCGTCGACATG	Aislamiento del gen <i>Tpcm1</i>
cmuR	CTACTCTTCGGGTATGAGCC	
CmuSpeI 1	ACTAGTGCAATCTCCATCCC	Obtención de sonda de <i>Tpcm1</i> con dianas <i>SpeI/BamHI</i>
CmuSpeI 2	GGATCCTACGTCTCGACCTT	
CmuSpeI 3	CTCGAGGCAATCTCCATCCC	Obtención de sonda de <i>Tpcm1</i> con dianas <i>XhoI/HindIII</i>
CmuSpeI 4	AAGCTTTACGTCTCGACCTT	
qPCR-cmuC	CGTCCACCTGCGACATTG	Expresión de <i>Tpcm1</i>
qPCR-cmuD	GCCTCTGCATCAAGTACTC	
Act-1-tricho	ATCGGTATGGGTCAGAAGGA	Expresión de gen endógeno
Act-2-tricho	ATGTCAACACGAGCAATGG	
TADIR2	TGACCACTTCGCTGCCTATC	Comprobación construcciones pSIL-cmu1 y pJL43b1-cmu1
INT-R	CATCCATGATAAGAGTCTGAG	
Universal	GTTGTAAAACGACGGCCAGT	Secuenciación extremos plásmidos
Reverso	AGGAAACAGCTATGACCATG	
Pcmu F	GACAGATTGAGATCAAGCAG	Amplificación 700 pb promotor <i>Tpcm1</i>
Pcmu R	GACTCACATGAGCTGGAAG	

**Tabla 3.** Oligonucleótidos usados cuando se empleó como molde ADN de tomate.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Aplicación
<i>ACT</i>	ACT-tomateF	CACCACTGCTGAACGGGAA	Expresión relativa de gen endógeno
<i>ACT</i>	ACT-tomateR	GGAGCTGCTCCTGGCAGTTT	
<i>AREB</i>	AREB Forward1	GCTCAACAGGAGGAGTGG	Señalización de ruta ABA
<i>AREB</i>	AREB Reversed1	CATCAACAGTCTTATGACTCAG	
<i>DREB3</i>	DREB3 Forward1	GAATCAGTTAACCCCAATTCA	Marcador resistencia a deshidratación
<i>DREB3</i>	DREB3 Reversed1	GCTTCGTGGGTTTTGGTGGCG	
<i>EIN2-F</i>	EIN2-Forward	GTTGCTAAGTGATGCTGTA	Señalización de ruta de ET
<i>EIN2-R</i>	EIN2-Reverse	CGCTCAAGCATGCTGGGCC	
<i>LOX1-F</i>	LOX1-Forward	GCCTCTCTTCTTGATGGAG	Señalización de ruta JA
<i>LOX1-R</i>	LOX1-Reverse	GTAGTGAGCCACTTCTCCAA	
<i>PR1</i>	PR1-fw1	CCTCAAGATTATCTTAACGCTC	Señalización de ruta SA
<i>PR1</i>	PR1-rev1	TACCATTGCTTCTCATCAACC	
<i>SOS1</i>	SOS1 Forward1	GGTGGACTTCTAAGCGCTAC	Marcador resistencia a sal
<i>SOS1</i>	SOS1 Reverse1	GAAATTTGATGACAGCTCCCC	

## 8.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

### 8.4.1. Electroforesis de ADN

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

1. Se añadió la cantidad adecuada de agarosa al volumen necesario de tampón TAE 1X y se fundió por ebullición en un microondas.
2. Se dejó enfriar entre 55-60°C y se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final aproximada de 1 µg/mL.
3. Se vertió el gel en la bandeja de electroforesis y se dejó que solidificara.
4. Se prepararon las muestras añadiendo tampón de carga 6X.
5. Se llevó a cabo la electroforesis en tampón TAE 1X aplicando un voltaje aproximado de 5 V/cm de longitud de la cubeta, y se incluyeron, en el gel, marcadores de ADN de pesos moleculares conocidos.
6. Se visualizaron las bandas mediante iluminación con luz ultravioleta, y se tomó una imagen del gel si procedía.

**Tampón TAE 50X:** Tris-acetato 2 M, pH 8,0; EDTA 50 mM. Se pesaron 242 g de Tris, se añadieron 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% (p/v); azul de bromofenol al 0,25% (p/v); xileno cianol FF al 0,25% (p/v).

#### 8.4.1.1. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de interés se cortaron del gel de agarosa con la ayuda de un bisturí y de forma rutinaria se purificaron utilizando el *kit* “NucleoSpin<sup>®</sup>” (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### 8.4.2. Electroforesis de ARN

Para las electroforesis de muestras de ARN, los tampones se prepararon en agua-DEPC. El resto del material necesario (cubetas, peines, bandejas) se mantuvo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante al menos 30 minutos y, posteriormente, se lavó con agua-DEPC.

Para comprobar la calidad del ARN extraído, se hizo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Se consideró que el ARN extraído era de calidad cuando pudieron apreciarse de manera clara e intensa las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18 y 28S.

## 8.5. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca. Para productos de PCR y ADN plasmídico, se utilizaron entre 50-100 y entre 400-600 ng de ADN, respectivamente, por cada kb de longitud del producto a secuenciar y 3 pmoles del oligonucleótido de interés, en un volumen final de 8  $\mu$ L.

## 8.6. Hibridación del ADN

### 8.6.1. Transferencia de ADN a membrana

Se realizaron digestiones de aproximadamente 20  $\mu$ g de ADN genómico, como se describe en el apartado 8.2.1, con la enzima *SacI*. Los fragmentos originados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, conteniendo bromuro de etidio, aplicando un voltaje de 55 V durante 8 horas. Una vez fotografiado el gel se sometió al siguiente protocolo:

1. Se trató con ácido HCl 0,5 N durante 15 minutos en agitación moderada, con el fin de fragmentar o crear mellas en las moléculas de ADN mayores de 10 kb. A continuación, se lavó dos veces con agua destilada.
2. Se bañó, con agitación moderada y por este orden, en: solución desnaturalizante durante 45 minutos, dos lavados con agua destilada y solución neutralizante durante 45 minutos. Y se equilibró con el tampón SSC 10X, en agitación durante 1 hora.
3. Los fragmentos de ADN se transfirieron, por capilaridad, desde el gel a una membrana de nylon Hybond<sup>TM</sup> N<sup>+</sup> (Amersham), en el tampón SSC 10X durante 24 horas. Para ello, el gel se situó sobre un soporte que tenía papel de filtro Whatman<sup>®</sup> 3MM (dos láminas) y dentro de un tanque de tampón SSC 10X, los filtros en contacto con el tampón. Sobre el gel se colocaron sucesivamente, la membrana de nylon del tamaño del gel, 2 capas de papel Whatman<sup>®</sup> 3MM, una columna de papel absorbente y, finalmente, un peso de 0,5 kg para facilitar la transferencia.
4. La membrana se lavó en tampón SSC 6X durante 5 minutos y se dejó secar entre dos láminas de Whatman<sup>®</sup> 3MM.
5. El ADN se fijó a la membrana por irradiación con luz ultravioleta en un *Stratalinker* (Stratagene), aplicando 120 mJ durante 30 segundos.

**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.

### 8.6.2. Prehibridación, hibridación y lavados

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. La prehibridación se llevó a cabo en 50 mL de solución de hibridación (cantidad inferior a 100  $\mu\text{L}$  por  $\text{cm}^2$  de membrana) y la incubación se realizó a 65°C durante 2 horas. La hibridación se realizó en un volumen de 10 mL de solución de hibridación a la que se incorporó la sonda marcada con digoxigenina, según se describe en el apartado 8.3.1.1, y previamente desnaturalizada por calor, incubando a 65°C durante 12 horas.

La membrana se lavó con soluciones de lavado de fuerza iónica cada vez menor (desde SSC 2X con SDS al 0,1% hasta SSC 0,1X con SDS al 0,1%) y a temperaturas cada vez más altas (de 37 a 65°C), para seleccionar las hibridaciones más específicas.

**Tampón de hibridación:** para preparar 200 mL, se añadieron en este orden 148 mL de agua, 0,4 mL de SDS al 10%, 2 mL de sarcosina al 10% (p/v), 2 mL de una solución de "Blocking Reagent" (Roche) al 10% y 50 mL de SSC 20X. El "Blocking Reagent" se prepara al 10% añadiendo el polvo en tampón ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M ajustado el pH a 7,5 con NaOH sólido, calentado a 65°C, autoclavado y conservado a 4°C.

### 8.6.3. Detección

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 protocolo que proporciona la casa comercial:

1. Tras llevar a cabo los lavados, se trató la membrana con tampón de lavado (*washing buffer*) a temperatura ambiente durante 5 minutos.
2. Se añadió sobre la membrana la solución de bloqueo y se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. Se añadió sobre la solución anterior el anticuerpo *AntiDIG-AP Fab fragments* (Roche) a una dilución 1:20000 y se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. Se hicieron dos lavados de 15 minutos con tampón de lavado.
5. Se añadió el tampón de detección durante 3-5 minutos para equilibrar la membrana.
6. Se retiró el tampón y se añadió el reactivo *CDP-Star* (Roche), diluido 1:1000 en tampón de detección, sobre la membrana y se cubrió la misma con un papel de plástico transparente para facilitar la distribución del reactivo por toda la superficie de la membrana. Se incubó 5 minutos en oscuridad.

7. Finalmente, se expuso la membrana en un equipo de captura de quimioluminiscencia FUJIFILM LAS-100.

**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.

#### 8.6.4. Reutilización de membrana

Las membranas se sometieron a los siguientes lavados para su reutilización:

1. Un lavado de 2 minutos en agua destilada estéril.
2. Dos lavados de 15 minutos a 37°C en una solución de NaOH 0,2 M con SDS al 0,1%.
3. Dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente en SSC 2X.
4. Y, finalmente, la membrana se sumergió en SSC 2X y se conservó a 4°C.

## 9. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

### 9.1. Obtención y cuantificación de proteínas intracelulares de *T. parareesei*

Las proteínas intracelulares se obtuvieron a partir de micelios de las cepas de *T. parareesei* crecidas bajo las condiciones descritas en el apartado 4.2.4. Se utilizaron 0,5 mL de una solución de Tris-HCl 100 mM pH 7,5 y SDS al 10% (p/v) por cada 50 mg de micelio liofilizado, y la mezcla se homogenizó mediante una incubación a 800 rpm y 4°C durante una hora. Seguidamente, la muestra se centrifugó a 12000 rpm y 4°C durante 20 minutos y el sobrenadante se recuperó y conservó a -20°C hasta su uso. Para proteínas destinadas a ensayos de actividad corismato mutasa se siguió una metodología diferentes que se detalla dentro del apartado dedicado a la determinación de dicha actividad.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad). Para reacciones de 1 mL, se mezclaron 2 µL del extracto proteico, convenientemente diluido, con 798 µL del tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5 y 200 µL del reactivo Bradford. Las muestras se homogenizaron e incubaron a 37°C durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína se determinó por extrapolación sobre una recta patrón realizada simultáneamente con diluciones seriadas de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) en un rango de concentraciones conocidas entre 1-20 µg/mL.

## 9.2. Determinación de actividades enzimáticas

### 9.2.1. Actividad corismato mutasa

La actividad corismato mutasa, que cataliza el paso de corismato a pufenato en la célula, se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método descrito por Davidson y Hudson (1987), con algunas modificaciones. Este método se basa en la detección del fenilpiruvato que se forma a partir de pufenato cuando se acidifica el medio.

Se partió de micelio crecido bajo condiciones descritas en el apartado 4.2.4 de materiales y métodos. El micelio se recogió por filtración, se eliminó la humedad con papel secante, se añadieron 5 veces su volumen de tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, conteniendo 0,1 mM del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma), y se homogenizó, con la ayuda de un *potter*. La mezcla se centrifugó a 10000 x g y 4°C durante 10 minutos, y el sobrenadante se recogió en un tubo limpio y se sometió a un prefraccionamiento con objeto de concentrar en la muestra las proteínas de masa superior a 10 kDa. Para ello, 3,5 mL de extracto proteico se pasaron por una columna Amicon Ultra-4, *cut-off* 10 kDa, (Millipore) y se centrifugó a 7500 x g y 4 °C durante 10 minutos, hasta recuperar una sexta parte del volumen inicial. Y, el contenido de proteína total se cuantificó como se indica en el apartado 9.1 de materiales y métodos.

La reacción se llevó a cabo, por triplicado, en un volumen final de 200 µL y utilizando una placa *microtiter* de 96 pocillos con fondo plano. Se preparó una mezcla con los siguientes compuestos: de ácido corísmico 1 mM (Sigma), BSA 0,1 mg/mL, 2-mercaptoetanol 10 mM y 40 µL del tampón Tris-HCl 50 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0. Los componentes de la reacción se mezclaron con una punta de micropipeta, se agregaron 20 µL del extracto proteico y la mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos. Se añadieron 40 µL de HCl 1 M, para favorecer la conversión de pufenato a fenilpiruvato, y se incubó a 37°C durante 10 minutos. La reacción se paró con 100 µL de NaOH 2,5 M y se midió la absorbancia a 340 nm. Para cada una de las muestras se incluyó un control negativo, también en triplicado, donde el extracto proteico se añadió a los pocillos después de parar la reacción. Una unidad de actividad corismato mutasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de corismato a pufenato por minuto a 37°C.

### 9.2.2. Actividad quitinasa

Para llevar a cabo el ensayo de actividad quitinasa, se empleó como sustrato quitina coloidal diluida en un tampón fosfato 70 mM pH 6,0 a una concentración de 0,25 mg/mL. Se mezclaron 200 µL de quitina coloidal y 50 µL del extracto proteico (obtenido según el apartado 9.1 de materiales y métodos) y la muestra se incubó a 37°C durante 1 hora. La reacción se paró por calentamiento a 100°C durante 10 minutos, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos y se recogieron 200 µL del sobrenadante en



un tubo nuevo, en los que se determinó la concentración de N-acetil glucosamina (NAcGln). En el ensayo se incluyó como blanco una muestra sin sustrato.

La cuantificación de NAcGln en las muestras se realizó de acuerdo al método descrito por Rensing y col. (1995). En un tubo se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra problema y 160  $\mu\text{L}$  de bórax 0,2 M, la muestra se hirvió durante 3 minutos y se pasó a un baño de hielo. Se añadió 1 mL de p-dimetil aminobenzoaldehído al 10% (p/v) en ácido acético 15,2 N y HCl 1,25 N, diluido 10 veces con ácido acético glacial. Se incubó a 37°C durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 585 nm. La medida de la concentración de NAcGln se realizó por extrapolación sobre una recta patrón realizada con soluciones de NAcGln de concentraciones conocidas y en un rango de 0 a 600  $\mu\text{g/mL}$ . Una unidad enzimática (1 U) fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de NAcGln por minuto bajo las condiciones del ensayo.

### 9.2.3. Actividad proteasa

La actividad proteasa se determinó utilizando el método descrito por Holwerda y Rogers (1992). La mezcla de reacción se preparó en un volumen de 600  $\mu\text{L}$  añadiendo: 415  $\mu\text{L}$  de tampón acetato 50 mM pH 5,5, 10  $\mu\text{L}$  del extracto proteico y 125  $\mu\text{L}$  de Brij 35 (Sigma) al 1% (v/v). Esta premezcla se incubó a 30°C durante 5 minutos y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  del sustrato azocaseína al 1% (p/v) (Sigma). La muestra se incubó a 30°C durante 1 hora y la reacción se paró con 400  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10% (p/v). La reacción se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, se recogiendo unos 800  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se midió la absorbancia a 366 nm. En paralelo, se obtuvo una recta patrón con concentraciones conocidas de azocaseína, en un rango de 0 a 500  $\mu\text{g/mL}$ .

### 9.2.4. Actividad celulasa

Para determinar la actividad celulasa de los extractos proteicos se midió la formación de azúcares reductores (Somogyi, 1952). En un tubo se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de una solución de carboximetil celulosa (CMC) al 1% (p/v) en tampón acetato 50 mM pH 5,5 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína total, y la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. Esa reacción se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto y se recogieron 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante. Se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de la solución Somogyi (Somogyi I: Somogyi II en proporción 4:1). La mezcla se hirvió durante 10 minutos, se pasó a hielo, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  del reactivo de Nelson y se agitó vigorosamente el tiempo necesario para eliminar el  $\text{CO}_2$  emergente. La muestra se diluyó hasta un volumen de 1,5 mL con agua deionizada, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto, y en 1 mL del sobrenadante se midió la absorbancia a 520 nm. La cuantificación de azúcares reductores en las muestras problema se obtuvo por extrapolación de una recta patrón, preparada en paralelo, con disoluciones de glucosa de concentraciones conocidas entre 0 y 600  $\mu\text{g/mL}$ . Una unidad

enzimática (1 U) fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo.

**Reactivo de Somogyi I:** 15 g de tartrato potásico, 30 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 20 g de  $\text{NaHCO}_3$  en 300 mL de agua desionizada. La solución resultante se añadió sobre una solución de 180 g de  $\text{NaSO}_4$  en 500 mL de agua desionizada. Finalmente se completó hasta 1 L con agua desionizada y se conservó la solución a temperatura ambiente.

**Reactivo de Somogyi II:** 2 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 18 g de  $\text{NaSO}_4$  en 100 mL de agua desionizada. El reactivo se conservó a temperatura ambiente.

**Reactivo de Nelson:** se disolvieron 12,5 g de  $(\text{NH}_4^+)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 225 mL de agua desionizada y se mantuvo en agitación mientras se añadían 10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Por otro lado, se preparó una segunda solución de 1,5 g de  $\text{NaAsO}_3$  en 12,5 mL de agua destilada. Ambas soluciones se mezclaron y se mantuvo la mezcla a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas. El reactivo se conservó a temperatura ambiente y en un frasco topacio, para protegerlo de la luz.

## 10. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

### 10.1. Cuantificación de ácido salicílico (SA) mediante método colorimétrico

Se partió de sobrenadantes procedentes de cultivos de los hongos crecidos bajo condiciones descritas en el apartado 4.2.3 de materiales y métodos, recogidos por filtración y se siguió metodología previamente descrita (Leeman y col., 1996; Mercado-Blanco y col., 2001), con pequeñas modificaciones que se indican a continuación:

1. Se extrajeron 4 mL de sobrenadante de cultivo, previamente acidificado hasta pH 2,0 con HCl, con 2 mL de cloroformo (agitación y separación de fases).
2. Se recuperó la fase clorofórmica, y la fase acuosa se extrajo nuevamente con 2 mL de cloroformo. Y, se juntaron las fases clorofórmicas de ambas extracciones.
3. A esa muestra (fase clorofórmica) se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  2 M y 4 mL de agua desionizada. Se agitó y, después de separarse nuevamente dos fases, se recogió 1 mL de la fase acuosa para medir la absorbancia a 527 nm

La cantidad de SA en las muestras problema se determinó por extrapolación en una recta patrón preparada, en paralelo, con concentraciones conocidas de SA desde 0 a 2 mM.

### 10.2. Cuantificación de metabolitos mediante HPLC-MS

Se partió de 100 mL de sobrenadantes de cultivos (procedentes de dos réplicas biológicas) de 48 horas obtenidos tras incubar la cepa T6 o los transformantes de *T. parareesei* S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 en tres medios diferentes,

PDB, MM-glucosa 2% y MM-glucosa al 2% suplementado con Tyr 5mM, Phe 5 mM y Trp 2 mM. Cada sobrenadante, se concentró por liofilización, hasta obtener un polvo, que se resuspendió en 2 mL de una solución agua:metanol (9:1) y se filtró a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Estas muestras se enviaron al servicio de masas de la Universidad de Salamanca para la cuantificación de los compuestos SA, tirosol e IAA. Los análisis se realizaron mediante cromatografía líquida de HPLC empleando como detección espectrometría de masas por ionización de *electrospray* con detección en modo positivo para el IAA y en modo negativo para el SA. El tirosol se analizó por cromatografía de gases masas.

## 11. ENSAYOS DE CRECIMIENTO

### 11.1 Ensayos con *T. parareesei*

#### 11.1.1. Cantidad de inóculo y presencia de Phe, tirosol y Trp

En un ensayo en placa *microtiter* se evaluó la influencia en el crecimiento de *T. parareesei* de la cantidad de inóculo del hongo y la presencia de tirosol en el medio de cultivo. Se utilizaron placas de 96 pocillos con 120  $\mu\text{L}$  de medio PDB por pocillo, inoculadas con  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  ó  $10^5$  esporas /pocillo y, a su vez, conteniendo 0, 10, 20 ó 50 mM de tirosol. Las placas se incubaron en cámara húmeda a 28°C con agitación moderada y se midió la absorbancia a 590 nm tras 4, 6, 22, 24 y 26 horas de incubación. Para cada condición ensayada, se emplearon triplicados y sus blancos correspondientes (pocillos que contenían la mezcla pero sin esporas).

También se utilizó un ensayo de crecimiento en medio sólido para evaluar el efecto de Phe, tirosol y Trp en el crecimiento de *T. parareesei*. Se inocularon 200 esporas del hongo en placas conteniendo medio PDA suplementado o no (control) con 10, 15, 30, 50 o 100 mM de cada uno de estos compuestos por separado. Las placas se incubaron en oscuridad a 28°C durante 48 horas. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresan como porcentajes de crecimiento respecto a sus correspondientes controles, dando un valor de 100% al mayor diámetro de crecimiento.

#### 11.1.2. Distintos medios de cultivo

Características fenotípicas como crecimiento, esporulación y pigmentación del medio de cultivo de cepas de *T. parareesei* (silvestre y transformantes) se compararon tras su crecimiento en los medios PDA, PPG, MEA, MS o MM-glucosa al 2%. Las placas se inocularon con 200 esporas del hongo, se incubaron durante 7 días en oscuridad a 28°C y se fotografiaron. El ensayo se realizó por triplicado para cada medio y cepa. El crecimiento se evaluó midiendo los diámetros de las colonias a las 48 horas de incubación.

Para los ensayos de complementación, se partió de medio MM-glucosa al 2% que se suplementó o no con Phe, Tyr o Trp, separadamente o en combinaciones de dos de ellos o los tres a una concentración de 10 mM cada uno. Las placas se incubaron con se describe en el párrafo anterior.

#### 11.1.3. Distintas temperatura de incubación

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de cepas de *T. parareesei* (silvestre y transformantes), se inocularon 200 esporas del hongo en placas conteniendo medio PDA. Las placas se incubaron a 22, 28 o 37°C, en oscuridad, durante 40 horas. Cada condición se evaluó en triplicado y los resultados se expresan, para cada cepa y temperatura, como diámetro de crecimiento de la colonia.

#### 11.1.4. Con exudados de plantas

Para los ensayos de crecimiento de las cepas de *T. parareesei* en medio líquido que contenía los compuestos exudados po plantas de tomate, se utilizaron cultivos hidropónicos *Trichoderma*-tomate. El medio líquido se obtuvo después de colocar 20 semillas de tomate en cada caja *Phytatray II* sobre una gasa colocada encima de una reja de acero inoxidable, sosteniendo la gasa 1 cm por encima de 100 mL de medio MS. Las cajas *Phytatray II* se incubaron durante 12 días sobre un agitador orbital a 80 rpm en un fitotrón, mantenido a las condiciones descritas en el apartado 4.4 de materiales y métodos. En paralelo, se mantuvo MS en tubos *falcon* estériles bajo idénticas condiciones de incubación para ser utilizado como medio control.

Pasados los 12 días, se recogieron el medio contenido en las cajas *Phytatray II* y el de los tubos *falcon* y se utilizaron para rellenar placas *microtiter* a razón 120 µL de medio líquido por pocillo. Para cada cepa y medio, cada pocillo se inoculó con 2000 esporas, contenidas en 10 µL de agua estéril, y se utilizaron triplicados. El crecimiento de las cepas se determinó, tras incubar las placas *microtiter* durante 48 horas a temperatura ambiente o a 37°C, midiendo la absorbancia a 620 nm.

### 11.2. Ensayos con tomate

Para determinar el efecto de la Phe, el tirosol o el Trp en la germinación y el crecimiento de plantas de tomate se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro conteniendo medio MS suplementado o no (control) con 2, 10, 50, 100, 250 o 500 µM de Phe; con 2, 10, 50, 100, 250, 1000 o 5000 µM de tirosol; o con 2, 10, 50, 100, 250, 1000 o 5000 de Trp. Las placas se incubaron en un fitotrón bajo las condiciones descritas en el apartado 4.4 de materiales y métodos. El porcentaje de germinación para cada condición de cultivo se determinó a los 5 días de sembradas las semillas y, tres días más tarde, las placas se fotografiaron y se midió la altura (cm) de la parte aérea de las plántulas.

## 12. ENSAYOS ANTIFÚNGICOS

### 12.1. Cultivos duales

La cepa silvestre T6 y los transformantes de *T. parareesei* S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 se enfrentaron a los patógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. ultimum* o *R. solani* en placas de PDA o MEA (para *B. cinerea*). Cilindros de agar de 5 mm de diámetro procedentes de colonias en crecimiento activo de *T. parareesei* y de los patógenos se colocaron en el medio de cultivo a una distancia de 5,5 cm, se incubaron a 28°C durante 10 días y las placas se fotografiaron. Se analizó el comportamiento del crecimiento de cada cepa de *Trichoderma* frente a los patógenos. Cada uno de los enfrentamientos se llevó a cabo por triplicado.

### 12.2. Ensayos de membranas

Discos de micelio de 5 mm de la cepa silvestre T6 o de los transformantes de *T. parareesei* S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4, se inocularon en el centro de placas de PDA, sobre una membrana de celofán o una membrana de diálisis de celulosa de 14 kDa de tamaño de poro, y se incubaron a 28°C durante 36 horas. Pasado este tiempo, se retiraron las membranas, y se sembraron discos de 5 mm de cultivo de los patógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. ultimum* o *R. solani*. Como controles, estos patógenos fueron inoculados en un medio donde no se había cultivado *T. parareesei*. Todas las placas se incubaron a 25°C durante varios días. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes patógenos por las diferentes cepas de *T. parareesei*, en celofán o en celulosa. Para cada situación se midieron los diámetros de seis placas.

## 13. ENSAYOS *T. parareesei*-TOMATE *IN VITRO*

En los ensayos realizados *in vitro*, se incluyeron la cepa silvestre T6 y los transformantes de *T. parareesei* S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 con fines comparativos.

### 13.1. Efectos sobre el desarrollo de plantas de tomate

#### 13.1.1. Efecto del hongo

Semillas de tomate fueron sembradas en placas Petri conteniendo 20 mL de medio MS con 0 o 10 mM de NaCl. A los tres días de incubación en un fitotrón, condiciones descritas en el apartado 4.4, las placas se inocularon con 200 esporas de *T. parareesei* a 1,5 cm de distancia del borde, por el lado de las raíces. Dos días después de la inoculación del hongo, las placas se fotografiaron y se determinó el porcentaje de

germinación y la altura de las plántulas. Para cada condición ensayada, se incluyeron cinco placas por condición con 7 semillas por placa.

### 13.1.2. Efecto del sobrenadante

Semillas de tomate se sembraron en cajas *Phytatray* conteniendo 100 mL de medio MS semisólido (agar al 0,5% p/v) adicionado o no con 2, 10 o 25 mL de sobrenadante de cultivo del hongo en medio MM-glucosa 2%, obtenido como se detalla en el apartado 4.2.3 de materiales y métodos. Las cajas *Phytatray* se incubaron bajo las condiciones descritas en el apartado 4.4 de materiales y métodos durante 5 días. Después de este tiempo, se determinó el porcentaje de germinación de las semillas. Tres días más tarde, se midió las longitudes de parte aérea y de raíz principal; y la cantidad y tamaño de raíces laterales en base a la escala de muy pocas, pocas, abundantes y muy abundantes. Los resultados son media de tres réplicas por condición y 20 semillas por réplica.

## 13.2. Colonización de raíces de tomate

Para evaluar cómo influye el silenciamiento génico de *Tpcm1* en el hongo sobre su capacidad colonizadora de raíces de tomate se utilizó un ensayo *in vitro* en el que se incluyeron la cepa silvestre T6 y los transformantes de *T. parareesei* S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4. Plántulas de tomate de 10 días crecidas bajo condiciones de cultivo hidropónico, este sistema de cultivo se detalla en Rubio y col. (2014), se inocularon con  $10^5$  germínulas de *T. parareesei*, obtenidas como se describe en el apartado 4.2.2 de materiales y métodos. A las 48 horas de aplicar el hongo, se recogieron raíces de 9 plantas por condición y se extrajo el ADN, según se describe en el apartado 7.3 de materiales y métodos. La cuantificación del ADN fúngico en las raíces de tomate se realizó mediante *Real-time* PCR. La preparación de las mezclas de PCR y las condiciones de amplificación se describen en el apartado 8.3.3 de materiales y métodos. Se utilizaron el gen de la *actina* del hongo y de la planta como genes de referencia y triplicados de cada muestra. La cantidad de ADN fúngico se estimó extrapolando los valores Ct sobre una recta patrón obtenida a partir de cantidades conocidas de ADN del hongo. A su vez, estos valores se normalizaron con la cantidad de ADN de tomate presente en la muestra, calculada a partir de una recta patrón obtenidas con cantidades conocidas de ADN de tomate.

## 14. ENSAYOS *T. parareesei*-TOMATE *IN VIVO*

En los ensayos realizados *in vivo* se testaron la cepa silvestre T6 y los transformantes de *T. parareesei* S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 con fines comparativos.

### 14.1. Ensayos bajo estrés salino

Plantas de tomate de 2 semanas crecidas bajo condiciones de invernadero, según se describe en el apartado 4.4 de materiales y métodos, se inocularon o no (control) con 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de una cepa de *T. parareesei*. En un ensayo, dos semanas después, la mitad de las plantas se sometieron a un riego con agua (5 mL por planta) y la otra mitad a un estrés salino (riego con 5 mL de NaCl 200 mM), que se prolongó durante dos semanas. Pasado este tiempo, se midió la altura de las plantas, y se fotografiaron. Se ensayaron 6 condiciones diferentes para cada uno de los dos tratamientos (sin y con estrés salino) y se utilizaron 6 macetas, con dos plantas por maceta, para cada condición. En otro ensayo, las plantas, a los 5 días de inocular el hongo y durante 15 días, se sometieron a un estrés salino utilizando una lámina de 2 L de NaCl 300 mM por bandeja. Se utilizaron 8 plantas por condición, bandejas de 52x37x7 cm de tamaño con 12 macetas por bandeja, y se evaluaron el grado de clorosis, estableciendo una escala con tres grados diferentes (moderado, medio y máximo) y caída de hojas verdaderas, que se expresa en porcentaje.

### 14.2. Ensayos de infección con *B. cinerea*

Hojas procedentes de plantas de tomate después de 48 horas o de 15 días de aplicar 2 mL de agua (control) o de una solución de  $10^6$  esporas/mL de una cepa de *T. parareesei* cuando las plantas tenían 2 semanas de edad, se utilizaron para evaluar la capacidad de las diferentes cepas para inducir respuestas de defensa frente al patógeno *B. cinerea*.

Las hojas se colocaron sobre esponjas, previamente mojadas en agua, y se inocularon con 15  $\mu$ L de una solución de germinación compuesta por glucosa 20 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM, pH 6,5, y que contenía 1500 esporas del patógeno. Las hojas inoculadas artificialmente se mantuvieron en una cámara húmeda, en oscuridad, y a 24°C durante 4 días. Se midió el diámetro de las lesiones y se utilizó una escala de 0 (ausencia de lesión) a 5 (lesiones superiores a 1,5 cm de diámetro) para cuantificar las lesiones provocadas por *B. cinerea*.

### 14.3. Ensayos de infección con Pst

Plantas de tomate de 2 semanas, crecidas bajo condiciones de invernadero, y tratadas o no (control) con una cepa de *T. parareesei*, como se describe en el apartado 14.2 de materiales y métodos, se utilizaron para evaluar la capacidad de las diferentes cepas para inducir respuestas de defensa frente al patógeno Pst en tomate. A su vez, se utilizaron dos cepas del patógeno, con distinto grado de virulencia, Pst3000 y Pst3118 (cor<sup>-</sup>), que se crecieron en los medios y bajo las condiciones descritas en los apartados 3.1 y 4.1 de materiales y métodos.

Para cada una de las dos cepas de Pst ensayadas, la infección se realizó por inmersión del follaje de la planta, durante 10 segundos, en una solución bacteriana de una densidad óptica de 0,005 a 600 nm, a la que se añadió posteriormente el surfactante Silwet L-77 al 0,03%. Las soluciones bacterianas se prepararon a partir de cultivos de 14-16 horas a 28°C, de los que las bacterias se recogieron por centrifugación a 2500 rpm y 4°C durante 5 minutos, y se resuspendieron en 1 L de MgCl<sub>2</sub> 10 mM hasta alcanza una densidad óptica de 0,005. Una vez inoculadas las plantas artificialmente con el patógeno, se mantuvieron en condiciones de alta humedad a temperatura ambiente durante 72 horas. El grado de infección de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos se cuantificó mediante un recuento de bacterias presentes en hoja. Se utilizaron 3 plantas, tomadas al azar, de cada condición y un disco de hoja de 5 mm de diámetro por planta, recogido éste de las hojas superiores. Al material de hoja recogido, se añadió 1 mL de agua estéril y la muestra se homogenizó con ayuda de un agitador Silamat<sup>®</sup> S5. Se prepararon diluciones seriadas y se sembraron, en triplicado, 100 µL de cada muestra en medio KB, suplementado con el/los antibiótico-s adecuado-s según la cepa de Pst ensayada (apartado 3.1 de materiales y métodos). Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas y se realizó el recuento de colonias en la dilución-es adecuada-s. Los resultados se expresan como UFC de Pst por disco de hoja de tomate.

## 15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre ellos. Cuando se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se aplicó el test de comparación múltiple de Tukey-HSD (*Honestly Significant Difference*), del programa *Statistix* versión 8.0 para Windows, que determina entre que tratamientos se presentan dichas diferencias.

## 16. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y SOFTWARE UTILIZADOS

### 16.1 Búsqueda de secuencias similares en bases de datos

#### 16.1.1. FASTA

El algoritmo FASTA (Pearson y Lipman, 1988) es una aproximación al algoritmo de Smith y Waterman (1981), que divide la secuencia en palabras solapadas, con una longitud de dos letras para proteínas o seis para ácidos nucleicos. Cada secuencia de la base de datos es dividida de la misma forma. Estas dos listas de palabras se comparan para encontrar palabras idénticas en ambas secuencias. Este método permite diferentes combinaciones entre ácidos nucleicos y proteínas, proporcionando un



valor, el *Z-score*, que después es convertido en un valor E (*E-value*), como en el caso del BLAST.

Las comparaciones de secuencias utilizando este algoritmo se realizaron en el servidor del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), disponible en la página *web* <http://www.ebi.ac.uk/fasta3>.

### 16.1.2. BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) constituye una colección de diferentes programas que permiten distintas combinaciones entre ácidos nucleicos y proteínas, sean estos las secuencias problema o de 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/>.

### 16.1.3. Alineamiento de secuencias

Hay dos tipos principales de alineamiento de secuencias: global y local. El global optimiza el alineamiento sobre toda la longitud de la secuencia, mientras que en el alineamiento local, prioriza alineamientos en fragmentos de la secuencia con una gran cantidad de coincidencias.

Un alineamiento múltiple de secuencias de proteínas de la misma familia nos proporciona información sobre la evolución de esta familia, ya que el alineamiento muestra la presión de la evolución en cada aminoácido y muestra también las posiciones que son clave para mantener el plegamiento y la función de las proteínas.

Para los alineamientos realizados en este trabajo se empleó el programa *ClustalX* (Thompson y col., 1994).

### 16.1.4. Otras manipulaciones de secuencias

La búsqueda de marcos de lectura abierta (*Open Reading Frames*, ORFs) sobre las secuencias de ADN, la traducción de los mismos a la secuencia proteica y un primer

análisis elemental de esta secuencia proteica se realizaron con el programa *EditSeq*, que forma parte del paquete informático *Lasergene* (DNASTAR Inc., Madison, EE.UU.).

Para ensamblar las secuencias parciales o los cromatogramas procedentes de un mismo clon se empleó el programa *Seqman II* (Lasergene, DNASTAR Inc.). El programa *Chromas* (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>) permitió el manejo de los cromatogramas y la exportación de las secuencias a otros formatos.

## 16.2. Análisis estructural de proteínas

Los métodos de predicción de la estructura secundaria de una proteína tratan de predecir si un residuo concreto pertenece a uno de estos 3 estados: hélice  $\alpha$ , hoja plegada  $\beta$  o bien, a segmentos irregulares o no ordenados de la proteína. Estos métodos han evolucionado mucho en los últimos años. Al principio se basaban en la probabilidad estadística de que un aminoácido concreto perteneciera a una de las tres estructuras posibles. Después, una segunda generación de estos métodos incluyó la influencia del ambiente local en el que se situaba cada aminoácido. La exactitud de estos métodos nunca superó el 60%. En la tercera generación, se incluyeron alineamientos múltiples como base de los métodos de predicción.

En la actualidad se usan métodos basados en redes neuronales, técnicas que permiten el aprendizaje del método. En este trabajo se usó el programa *PSIPRED* (Jones, 1999), que alcanza una exactitud del 75%. Está accesible vía *web* en la dirección <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>.

## 16.3. Análisis de los dominios de unión a factores de transcripción

La búsqueda de los dominios de unión a factores de transcripción presentes en la secuencia de ADN de las zonas reguladoras, se realizó con el programa *MatInspector Profesional* (Quandt y col., 1995). Este programa emplea la base de datos TRANSFAC y está disponible en versión de acceso limitado en la página *web* <http://genomatix.de>. También puede consultarse de forma gratuita, previo registro, en <http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html#transfac>.

## 16.4. Otras herramientas de predicción

La identificación de un posible péptido señal sobre la secuencia primaria de la proteína se llevó a cabo con el programa *SignalP* v2.0 (Nielsen y col., 1997), accesible en la dirección *web* <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP-2.0/>. Por otro lado, el análisis de la secuencia de la proteína mediante la aplicación *Scan Prosite* ([www.expasy.org/tools/scanprosite/](http://www.expasy.org/tools/scanprosite/)) reveló la presencia de posibles sitios de glucosilación, fosforilación, miristilación y sulfatación.

El perfil hidropático de las proteínas se calculó según el algoritmo de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) empleando la aplicación *Protean* (Lasergene, DNASTAR Inc.).

La predicción de la posible estructura tridimensional de la proteína se llevó a cabo en el servidor *web* ESyPred3D (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) que reconoce el plegamiento utilizando perfiles de secuencias y múltiples programas de alineamiento. Para analizar los modelos propuestos se empleó el programa de visualización de modelos *DeepView-Swiss-PdbViewer* disponible en la página *web* <http://www.expasy.ch/spdbv/>.

La temperatura de hibridación óptima de los oligonucleótidos incluidos en las mezclas de las reacciones de PCR se calculó utilizando el *PrimerSelect* (Lasergene, DNASTAR Inc.), programa disponible en la *web* <http://alces.med.umn.edu/rawtm.html>.

## 16.5. Herramientas de edición

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

***pDRAW*** ([www.acaclone.com](http://www.acaclone.com)). Se utilizó para dibujar y editar plásmidos a partir de su secuencia.

***DNA Strider*** (CEA, Gif sur Yvette, Francia). Se empleó para la edición de las secuencias de ADN y proteínas.

***Genedoc*** ([www.psc.edu/biomad/genedoc](http://www.psc.edu/biomad/genedoc)). Se usó para la edición de los alineamientos.

***Endnote*** (Thompson ISI ResearchSoft, [www.endnote.com](http://www.endnote.com)). Se utilizó para la gestión y edición de la bibliografía.

## 17. CASAS COMERCIALES

**Amersham:** Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia (<http://www.amershambiosciences.com>).

**Applied Biosystems:** Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU. ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

**Biotools:** Biotools B y M Labs, Madrid, España ([www.biotools.net](http://www.biotools.net)).

**Conda:** Laboratorio Conda, Madrid, España ([www.condalab.com](http://www.condalab.com)).

**Difco:** Difco Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU. ([www.difco.com](http://www.difco.com)).

**Duchefa:** Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Holanda ([www.duchefa.com](http://www.duchefa.com)).

**Eppendorf:** Eppendorf, Hamburgo, Alemania ([www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)).

**Fermentas:** Fermentas Life Science, Burlington, Ontario, Canadá ([www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)).

**Fujifilm:** Fuji Photo Film Europa, Düsseldorf, Alemania ([www.fujifilm.es](http://www.fujifilm.es)).

**Kapa Biosystems:** Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, EE.UU. ([www.kapabiosystem.com](http://www.kapabiosystem.com)).

**Machery-Nagel:** Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania ([www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)).

**Merck:** Merck KGaA, Darmstadt, Alemania ([www.merck.com](http://www.merck.com)).

**Millipore:** Millipore, Billerica, MA, EE.UU. ([www.millipore.com](http://www.millipore.com)).

**Promega:** Promega, Madison, WI, EE.UU. ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

**Qiagen:** Qiagen GmbH, Hilden, Alemania ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Radiber:** Radiber, S.A., Barcelona, España ([www.radiber.com](http://www.radiber.com)).

**Roche:** Roche Applied Science, Basilea, Suiza ([www.roche.com](http://www.roche.com)).

**Sigma-Aldrich:** Sigma-Aldrich Co., San Luis, MO, EE.UU. ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)).

**Takara:** Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japón (<http://www.takara-bio.com>).

**Thermo Scientific:** Thermo Electron Corporation, Ulm, Alemania ([www.thermo.com](http://www.thermo.com)).

**Stratagene:** Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU. ([www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)).

**Whatman:** Whatman Laboratory Products Inc., Clifton, NJ, EE.UU. ([www.whatman.com](http://www.whatman.com)).

## **RESULTADOS**

---

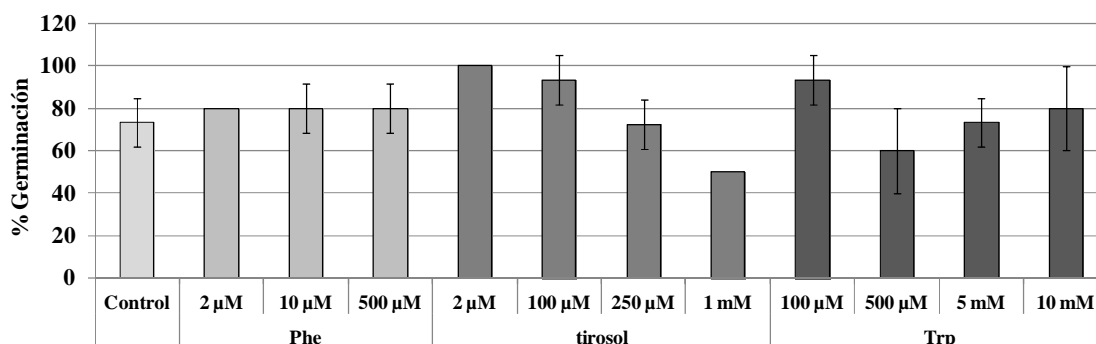


## 1. ESTUDIOS PRELIMINARES

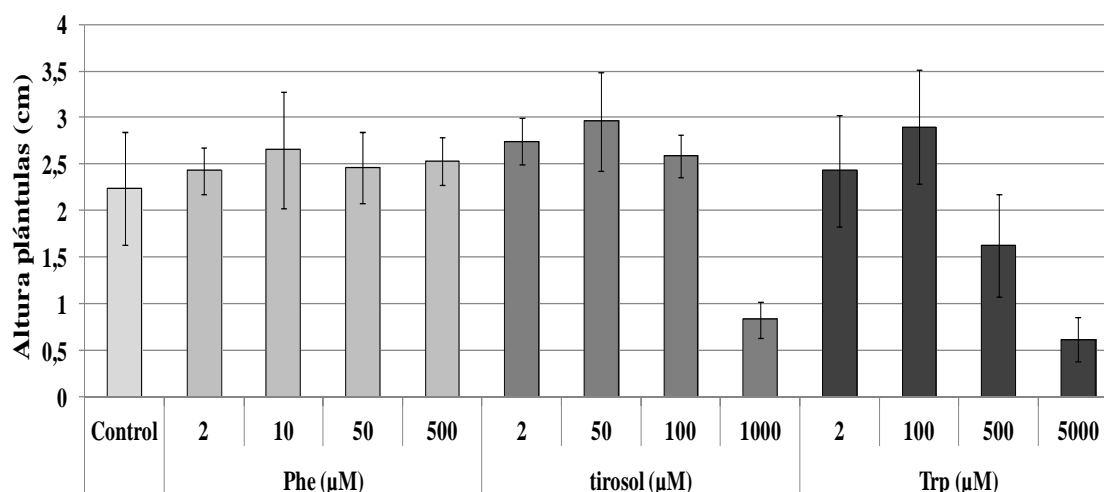
En colaboración con el grupo de investigación del Prof. Isidro González Collado (Universidad de Cádiz), se detectó tirosol en sobrenadante de *T. parareesei* T6 después de 5 días de crecimiento en PDB. Este metabolito que está descrito en levaduras como molécula señalizadora de *quorum-sensing*, no presentó esta capacidad en los ensayos realizados con *T. parareesei* T6 (datos no mostrados), ya que distintas concentraciones de tirosol (0-50  $\mu\text{M}$ ) en el medio no afectaron la duración de la fase de latencia de las curvas de crecimiento del hongo obtenidas a partir de diferentes concentraciones de inóculo ( $10^2$  a  $10^5$  esporas/pocillo).

Se utilizaron Phe, tirosol y Trp comerciales en ensayos *in vitro* con semillas de tomate, según se describe en el apartado 11.2 de materiales y métodos, para analizar el efecto que producían compuestos aromáticos de la ruta de shikimato en la germinación y desarrollo de plántulas de tomate. Los porcentajes de germinación de las semillas de tomate obtenidos bajo las diferentes condiciones de cultivo ensayadas se recogen en la Figura 9. En comparación con los porcentajes de germinación obtenidos en la condición control, concentraciones entre 2 y 500  $\mu\text{M}$  de Phe en el medio no afectaron a la germinación. El tirosol a bajas concentraciones (2 a 100  $\mu\text{M}$ ) favoreció la germinación, y ésta fue disminuyendo conforme aumentaba la concentración de este compuesto en el medio, llegando a una inhibición del 100% a una concentración de 5 mM (dato no mostrado). Concentraciones de 0,1 mM de Trp en el medio favorecieron la germinación y no se observaron diferencias cuando este compuesto se utilizó entre 0,5 y 10 mM.

En cuanto al efecto de estos tres compuestos sobre el crecimiento de plántulas (Figura 10), la altura de éstas no se vio afectada por la presencia de Phe en el medio, al menos entre 2 y 500  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, concentraciones entre 2 y 100  $\mu\text{M}$  de tirosol o Trp en el medio, incrementaron el tamaño de las plántulas mientras que concentraciones superiores afectaron negativamente el crecimiento de las mismas.



**Figura 9.** Efecto de Phe, tirosol y Trp en la germinación de semillas de tomate. Las semillas se cultivaron en medio MS suplementado o no (control) con 2, 10 o 500  $\mu\text{M}$  de Phe; con 2, 100, 250, 1000 o 5000  $\mu\text{M}$  de tirosol; con 100, 500, 5000 o 10000  $\mu\text{M}$  de Trp, durante 5 días. Los porcentajes de germinación son valores medios obtenidos de tres réplicas por condición y 7 semillas por réplica.



**Figura 10.** Efecto de Phe, tirosol y Trp en el crecimiento de plántulas de tomate. Las semillas se sembraron en MS suplementado o no (control) con 2, 10, 50 o 500  $\mu\text{M}$  de Phe; con 2, 50, 100 o 1000  $\mu\text{M}$  de tirosol; o con 2, 100, 500 o 50000  $\mu\text{M}$  de Trp y se cultivaron durante 8 días. Los resultados se expresan como valores de altura medios de tres réplicas por condición y 7 semillas por réplica.

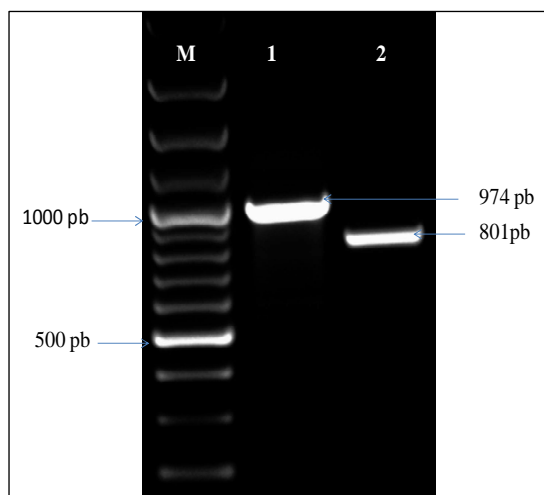
## 2. EL GEN *Tpcm1* de *T. parareesei*

### 2.1. Aislamiento del gen *Tpcm1*

*T. parareesei* ha sido descrita como una nueva especie muy próxima filogenéticamente a *T. reesei* (Atanasova y col., 2010). Ya que cepas de *T. parareesei* no han sido secuenciadas, la búsqueda de secuencias nucleotídicas de genes de la ruta del shikimato se realizó sobre el genoma secuenciado y anotado de *T. reesei* QM6a (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>). En dicha base de datos se localizaron la mayoría de los genes de esa ruta descritos en bibliografía y se detectó el gene ortólogo de *cmu1* que codifica una putativa corismato mutasa. Sobre su secuencia, de 974 pb, se diseñaron los oligonucleótidos *cmuF* y *cmuR* (Tabla 2 de materiales y métodos) y se amplificó, mediante una reacción de PCR convencional, y usando como molde genómico de *T. parareesei* T6, un fragmento de aproximadamente 974 pb. Tras secuenciar el fragmento amplificado, éste presentó un 100% de similitud nucleotídica con el gen *cmu1* de *T. reesei* QM6a. El gen aislado de *T. parareesei* se denominó *Tpcm1*.

El gen *Tpcm1* de *T. parareesei* tiene 974 pb de longitud que al traducir se rompe 2 veces la fase de lectura. El *cmu1* de *T. reesei* presenta dos intrones de 82 y 91 pb con un transcrito de 801 pb. Para comprobar si estos mismos intrones se encontraban presente en el gen *Tpcm1* de *T. parareesei*, se realizaron ampliaciones mediante la reacción de PCR con los oligonucleótidos *cmuF* y *cmuR* y empleando como molde ADN genómico o ADNc de *T. parareesei* (Figura 11). El menor tamaño observado para la banda amplificada a partir de ADNc de *T. parareesei* respecto a aquella obtenida de ADN genómico indicaría la presencia de esos intrones en *Tpcm1*.





**Figura 11.** Productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico (carril 2) y ADNc (carril 3) de *T. parareesei* T6, usando los oligonucleótidos cmuF y cmuR. El carril M: marcador XIV ADN ladder (Roche).

Los intrones son muy comunes en hongos filamentosos, aparecen aproximadamente en dos tercios de los genes descritos y suelen tener un tamaño relativamente pequeño, de 48 a 240 pb. Las secuencias que rodean los extremos 5' y 3' del intrón, así como la secuencia intermedia en la que se forma el lazo previo a la escisión del mismo, suelen estar conservadas (Ballance, 1986). Las secuencias típicas de procesamiento de intrones en 5' y 3', y de formación del lazo (Tabla 4), están presentes en los dos intrones identificados en el gen *Tpcm1*.

**Tabla 4.** Intrones del gen *Tpcm1*. Las secuencias consenso para hongos filamentosos están tomadas de Ballance (1986). En mayúsculas se muestran las coincidencias con la secuencia de referencia.

	Inicio de procesamiento	Sitio de formación de "lazo"	Fin de procesamiento
Consenso	GTAHGTY	WRCTRAC	MYAG
Intrón 82 pb	GTgAGTC	TtCTGAC	CCAG
Intrón 91 pb	GTggGaC	TACTGAC	tTAG

En *Trichoderma* se ha establecido una secuencia consenso para el entorno del AUG de los genes que resulta ser muy similar a la observada en otros hongos filamentosos (Goldman y col., 1998) y, como se observa en la Tabla 5, también a la del gen *Tpcm1*.

**Tabla 5.** Región adyacente al codón de inicio de traducción que aparece con más frecuencia en *Trichoderma* y la que presenta el gen *Tpcm1* (Goldman y col., 1998). En mayúsculas se muestran las coincidencias.

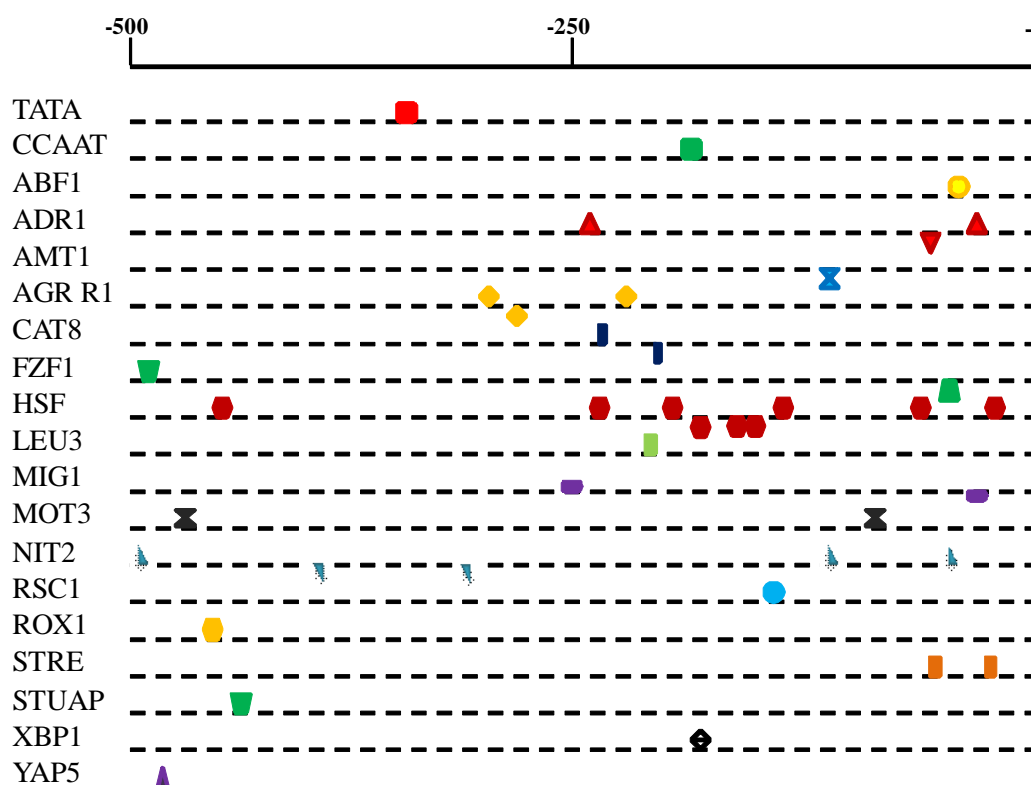
Secuencia consenso	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6
<i>Trichoderma</i>	T/C	C	A	A	A/C	A	U	G	A/Y	T/G	T/A
<i>Tpcm1</i>	T	C	A	g	C	A	U	G	G	a	T

## 2.2. Análisis *in silico* de secuencias nucleotídicas y de las secuencia aminoacídica de TPCMU1

### 2.2.1. Estudio de la región promotora del gen *cmu1* de *T. reesei*

Como se amplificaba región promotora del gen *Tpcm1* pero no se obtenía una secuencia limpia, se analizó la zona promotora del gen *cmu1* de *T. reesei* disponible en el genoma secuenciado de la cepa QM6a. Para buscar elementos fundamentales de una región promotora y que participan en la modulación de la transcripción del ADN, se realizó un análisis *in silico* de una secuencia de 500 pb aguas arribas del codón de inicio de traducción del gen *cmu1*. En la posición -340 respecto al codón de inicio, se encontró una secuencia idéntica a una caja TATA (5'-TATATAA-3') que se ajustaba perfectamente al consenso 5'-TATA(T/A)AA-3'.

Se llevó a cabo un análisis teórico para buscar sitios de unión para factores de transcripción cuyas secuencias consenso están definidas. Se empleó la aplicación *MatInspector* usando la base de datos TRANSFAC, restringidas a hongos, y el resultado se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Análisis teórico de 500 pb del promotor del gen *cmu1* de *T. reesei* QM6a. Las letras al inicio de cada línea indican un factor de transcripción, exceptuando la caja TATA y CCAAT. Los símbolos que aparecen encima de la línea corresponden a la cadena codificante, y los que aparecen debajo, se sitúan sobre la cadena complementaria.

Se encontró en la posición -185, respecto al condón de inicio, una caja CCATT que se ajustaba perfectamente al consenso 5'-CCAWT-3'. A esta última caja se une el complejo trimérico HAP2/3/4, implicado en la regulación de genes relacionados con el metabolismo del carbono (Zeilinger y col., 2001).

También se localizaron cinco secuencias 5'-HGATAR-3', a las que se une el factor de transcripción AreA/Nit2, que en varias especies fúngicas se ha relacionado con metabolismo del nitrógeno (Ravagnani y col., 1997). Tres de estas secuencias se encuentran en la cadena codificante (-42, -104 y -492) y otras dos en la cadena complementaria (-322 y -384). Nit2 es el principal regulador positivo de represión catabólica por nitrógeno que restringe la utilización de fuentes de nitrógeno complejas en la presencia de otras sencillas. En hongos fitopatógenos, Nit2 u homólogos de este factor de transcripción se han relacionado con su virulencia en planta (Bolton y Thomma, 2008; Horst y col., 2012).

Se localizaron dos secuencias 5'-SYGGRG-3', una en la cadena codificante y otra en la complementaria, en las posiciones -244 y -32, respectivamente. A esta secuencia se une la proteína Mig1/CreA/Cre1 (Mig1 en *S. cerevisiae*, CreA en *A. nidulans*, Cre1 en *T. reesei*), responsable de la represión catabólica por glucosa (Ilmen y col., 1996). En *T. reesei*, Cre1 está implicado en la regulación de *cbh1* en presencia de diferentes fuentes de carbón (Ries y col., 2014).

Se identificaron nueve secuencias 5'-nGAAn-3', seis de ellas en la cadena codificante (en las posiciones -22,-56, -132,-187,-226 y -436) y tres en la cadena complementaria (en las posiciones -146,-155 y -175). A esta secuencia se unen factores de transcripción *heat shock factor* (HSFs), reguladores positivos que activan la transcripción de genes que codifican proteínas de choque térmico (HSPs) en respuesta a estreses abióticos (Montero-Barrientos y col., 2010).

Se localizaron dos secuencias 5'-CCCCT-3', ambas secuencias en la cadena codificante (en posición -28 y -50), que son reconocidas por el factor de transcripción STRE, un regulador de respuesta a estreses abióticos (Peterbauer y col., 2002). Algunos genes de *Trichoderma* implicados en el micoparasitismo, como *chit33*, *prb1* y *chit36*, se inducen bajo distintas situaciones de estrés (Dana y col., 2001; Viterbo y col., 2002), y en sus promotores se han identificado cajas 5'-CCCCT-3'.

También se encontraron posibles sitios de unión para los siguientes factores de transcripción:

- ABF1 (*autonomously replicating sequence-binding factor 1*): se ha relacionado con replicación e inicio de transcripción en *S. cerevisiae* (Miyake y col., 2002).
- ADR1: activador de la alcohol deshidrogenasa II (Walter y Schüller, 2001), y regulador de genes del metabolismo del glicerol.

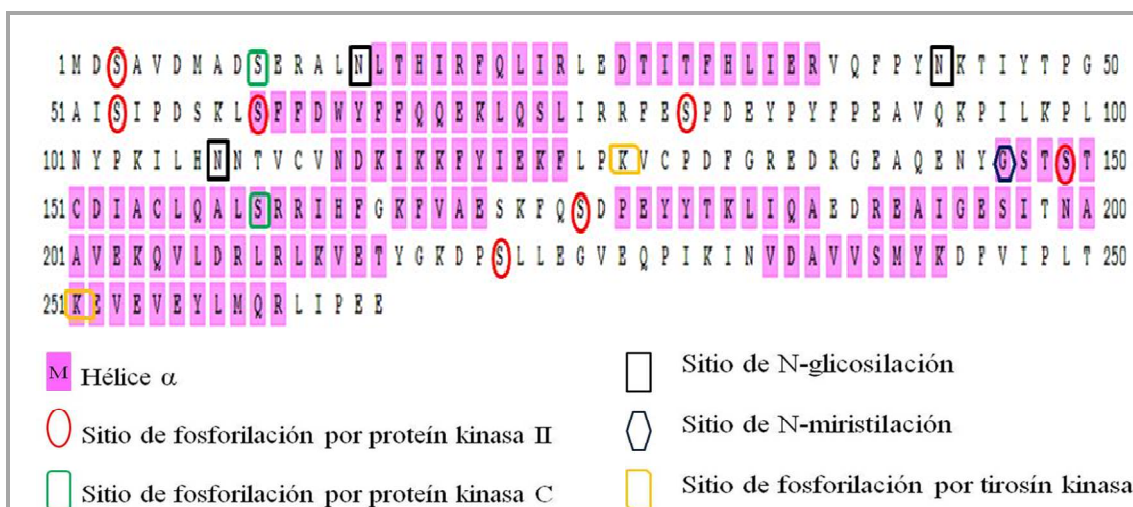
- AMT1 (*copper-activation transcription factor*). En levadura se ha caracterizado como un transportador que se activa por cobre (Graden y col., 1996).
- CAT8: activador de genes que codifican enzimas reguladas por fuente de carbono (Roth y Schüller, 2001).
- FZF1 (*five zinc finger*). En *S. cerevisiae*, se ha relacionado con el metabolismo del sulfito y con regulación mediada por óxido nítrico (Casalone y col., 1994; Sarver y Derisi, 2005).
- MOT3. En levaduras, represor de genes anaeróbicos y de la biosíntesis de ergosterol bajo condición de estrés (Montanes y col., 2011).
- StuAp (*Aspergillus nidulans Stunted protein*). En hongos filamentosos, este factor de transcripción regula *clusters* biosintéticos de metabolitos secundarios. Por ejemplo: en *Aspergillus fumigatus* regula la biosíntesis de alcaloides o de gliotoxina, y también se ha asociado con ciclo celular (Twumasi-Boateng y col., 2009); y en *Fusarium graminearum* se ha relacionado con el desarrollo de esporas, la patogénesis y la síntesis de metabolitos secundarios (Lysøe y col., 2011).
- XBP1 (*xhoI site-binding protein 1*): es un regulador negativo que actúa sobre la transcripción de genes específicos, pudiendo causar un retraso pasajero en el ciclo celular bajo condiciones de estrés como choque térmico, alta osmolaridad, estrés oxidativo o déficit de glucosa (Mai y Breeden, 1997). También se ha relacionado con regulación epigenética, participando junto a Rpd3p en la desacetilación de histonas (Gómez-González y col., 2011).
- YAP5. Estudios en levadura han demostrado que regula la respuesta transcriptómica a varios factores medioambientales como cadmio o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y al aumento del hierro citosólico (Li y col., 2008). También controla la expresión de glutaredoxina GRX4, un regulador de respuesta a hierro (Pimentel y col., 2012).

### 2.2.2. Análisis de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína TPCMU1

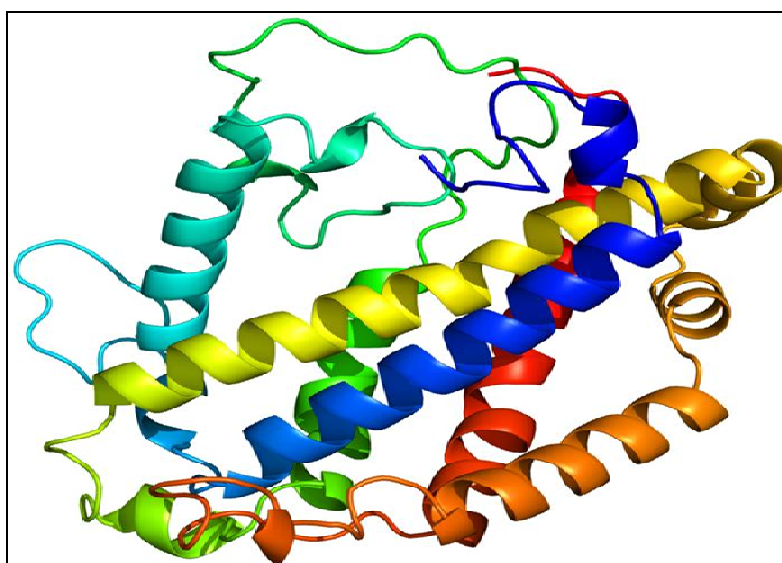
La secuencia del gen *Tpcm1* al traducirla, teniendo en cuenta la presencia de los intrones, da una proteína de 266 aminoácidos. El peso molecular teórico de la proteína madura es de 23,94 kDa y su punto isoelectrico teórico es de 5,44. La estructura primaria de la proteína deducida consta de 34 aminoácidos básicos (K, R) (12,8%), 42 ácidos (D, E) (15,8%), 66 polares (N, C, Q, S, T, Y) (28,8%) y 92 hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V) (34,6%). En la composición de aminoácidos, el que se encuentra en mayor proporción es ácido glutámico (9,45%), seguido por leucina (8,6%) e isoleucina (7,9%).

Se realizó una predicción *in silico* de la estructura secundaria de la proteína mediante el programa *PSIPRED*. Se observó que la estructura secundaria de TPCMU1 está conformada únicamente por regiones hélices  $\alpha$ . Además, el análisis de la secuencia aminoacídica, mediante la aplicación *Scan Prosite*, reveló la presencia de posibles sitios de fosforilación, miristilación y glicosilación (Figura 13). Se reconstruyó, a partir de su

secuencia, la estructura terciaria de TPCMU1 (Figura 14) mediante el programa *DeepView-Swiss-PdbViewer*.



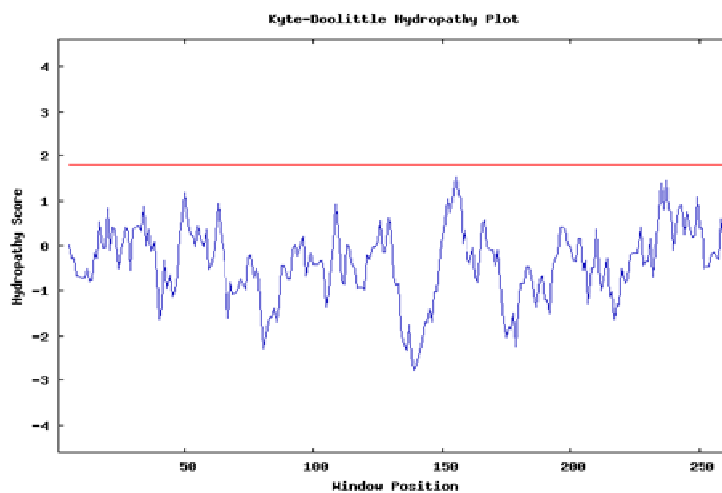
**Figura 13.** Secuencia de la proteína TPCMU1 incluyendo la predicción de su estructura secundaria llevada a cabo con el programa *PSIPRED* (Jones, 1999). Se ha marcado con fondo rosa las conformaciones en hélice  $\alpha$ . También se incluyen los posibles sitios de fosforilación, glicosilación y miristilación según el programa *Scan Prosite* ([www.expasy.org/tools/scanprosite](http://www.expasy.org/tools/scanprosite)).



**Figura 14.** Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína TPCMU1 utilizando el programa *DeepView-Swiss-PdbViewer*.

Al analizar *in silico* la secuencia de aminoácidos a través del programa *SignalP* v4.1, no se detectó presencia de péptido señal. Esto se explica si observamos el perfil hidropático de TPCMU1 (Figura 15), calculado según el algoritmo de (Kyte y Doolittle, 1982). La presencia de un péptido señal se relaciona con un alto grado de

hidrofobicidad, pero la proteína TPCMU1 tiene un marcado carácter hidrofílico en toda su secuencia.



**Figura 15.** Representación gráfica del perfil hidropático de TPCMU1 calculado mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982).

La secuencia total de la proteína TPCMU1 se comparó mediante el algoritmo FASTA con las secuencias presentes en la base de datos UNIPROT. Las proteínas con las que presentó mayor similitud se recogen en la Tabla 6. En la Figura 16 se muestra un alineamiento de TPCMU1 con algunas de las proteínas que se indican en la Tabla 6, realizado con el programa *ClustalX*.

**Tabla 6.** Proteínas de bases de datos con las que TPCMU1 presentó mayor similitud.

Microorganismo	Descripción	Nº $\alpha$	E	% Id	Nº Acceso
<i>T. reesei</i>	Hipotética	266	0,0	100	XP_006962415
<i>T. virens</i>	Hipotética	266	$1e^{-168}$	89	EHK43442
<i>T. atroviride</i>	Hipotética	265	$8e^{-167}$	88	EHK43442
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hipotética	266	$3e^{-147}$	79	ENH73846
<i>Nectria haematococca</i>	Hipotética	266	$1e^{-145}$	78	XP_003046676
<i>Fusarium graminearum</i>	Hipotética	273	$5e^{-144}$	76	EYB31241
<i>Colletotrichum sublineola</i>	Hipotética	266	$4e^{-141}$	74	KDN66105
<i>Togninia minima</i>	Hipotética	266	$1e^{-137}$	75	XP_007913807
<i>Neurospora crassa</i>	Hipotética	269	$2e^{-132}$	71	XP_961975
<i>Verticillium alfalfae</i>	Hipotética	268	$5e^{-130}$	71	XP_003009260
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Hipotética	266	$7e^{-125}$	69	XP_003714705

```

T. parareesei      MDSAVDMADSERALNLTHIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFPYKNTIYTPGAISIP-DSKL
T. reesei          MDSAVDMADSERALNLTHIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFPYKNTIYTPGAISIP-DSKL
T. virens         MDSAVDMADSSRALDLARIRFQLIRLEDTITYHFLIERVQFPLNKT IYTPGALPIP-DSGL
F. oxysporum      MDTVINMADAHAALDLARIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFALNGTIYVPGAVELP-EANL
F. fujikuroi      MDTVINMADAHAALDLARIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFALNGTIYVPGAVELP-EANL
N. haematococca   MDTVINMADAHAALDLARIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFALNSKIYVPGALELP-QGHH
O. sinensis       MDSVVDVADADKALDLSRIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFALNKT IYTPGAIQIP-GTDL
C. purpurea       MDTVVDMKDATKALDLSRIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFSLNKT IYTPGALDIP-NSNL
C. gloeosporioides MDSLIDLSDPSKALDLSRIRYQLIRLEDTITFHLIERAQFALNKT IYVPGALDIP-NSEL
T. minima         MDSVIDLSDPSKALDLSRIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFPLNHN IYVPGAVPIP-NSDL
Rosellinia sp     MDTIIDLKDASKALDLGNIRFQLIRLEDTITFHLIERVQFPLNKS IYQPGAIALGSDANL
** : ::: * . :*: * .*:*****:*****.*. * .** ***: ;

T. parareesei      SFFDWYFFQEQKLSLIRRFESPDEYPFPEAVQKPIKPLNYPKILHNNTVCVNDKIKK
T. reesei          SFFDWYFFQEQKLSLIRRFESPDEYPFPEAVQKPIKPLNYPKILHNNTVCVNDKIKK
T. virens         SFFDWYFFQEQKLSLIRRFESPDEYAFFPEAVQKPMKPLNYPKILHNNDVCVNDKIKK
F. oxysporum      SFLDWYFREQEKLQSLIRRFESPDEYFFPDALQNPILKPLNYPKILHENVNVNDKIKK
F. fujikuroi      SFLDWYFREQEKLQSLIRRFESPDEYFFPDALQSPILKPLNYPKILHENS VNVNDKIKK
N. haematococca   SFLDWYFSEQEKLQSLIRRFESPDEYFFYPEALQKPILDPLNYPKILHDNDVNVNDKIKK
O. sinensis       SFFDWYFSEQEKLQSLIRRYESPDEYFFPEAVQRPILKPLDYPKILHPNTVNVNADIKH
C. purpurea       SFFDWYFSEQEKLQSLIRRYESPDEYFFFPDAPVQTPILKPLNYPKILHPNVNVNDKIKK
C. gloeosporioides SFMDWYLRQEKLQSIIRRYESPDEYFFPEALQKQILKPLHYPRILHPNDVNVNDKIKK
T. minima         SLMDWYLQEQEKLQSLIRRFESPDEYFFPDSLNKSILOPLAYPKILHKNDVNVNDKIKK
Rosellinia sp     SFMDWYLQEQEKLQSLIRRYEAPDEYFFPDALQKPIKPLDYPKILHPNDVNVNEKIKR
*:***: :*****:***:*:***: :*:::: :*.** **:* ** * * ** .**

T. parareesei      FYIEKFLPKVCPDFGREDRGEAQENYGSTSTCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSQSDPE
T. reesei          FYIEKFLPKVCPDFGREDRGEAQENYGSTSTCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSQSDPE
T. virens         FYIEKFLPKVCPNFGREDRGESQENYGSTSTCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSQSDPE
F. oxysporum      FYTEKFLPAVCPDFGREERGESQENYGSTATCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSRDEE
F. fujikuroi      FYTEKFLPAVCPDFGREERGESQENYGSTATCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSRDEE
N. haematococca   FYIEKFLPAVCPDFGREERGESQENYGSTATCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSREEE
O. sinensis       FYIQTFPLPAVCPDFGRQDRGESQENYGSTATCDFACLQALSRRIHFGKLVAESKFSNPE
C. purpurea       FYIERFLPAVCPDFGRGDRGQSEENYSAATSDFACLQALSRRIHFGKFVAEAKFSQSDPE
C. gloeosporioides FYVDTFLPALCPDFGREDRGESQENYSSATCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSQSDPE
T. minima         FYIEQFLPAVCPDFGREDRGVSQENYSAATCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSQSDPE
Rosellinia sp     FYIERFLPAVCPDFGRGDGDEL DENYSSATCDIACLQALSRRIHFGKFVAESKFSQSDPE
** : *** :** *** : * :*****:*.*:*****:***:***:***:*: *

T. parareesei      YYTKLIQAEDREAIGESITNAAVEKQVLDRLRLKVEITYGKDP SLLGVEQP I KINVDVAVV
T. reesei          YYTKLIQAEDREAIGESITNAAVEKQVLDRLRLKVEITYGKDP SLLGVEQP I KINVDVAVV
T. virens         LYTQLIKDENREAIGESITNRAVEEQVLARLR LKAETYGKDP SMLGVEQP VKIDVDVAVV
F. oxysporum      KYTRLIKAEDREGIAESITNAAVEKVLRLRLKALTYGKDP S I PDGTEGAAK IDVDVAVV
F. fujikuroi      KYTRLIKAEDREGIAESITNAAVEKVLRLRLKALTYGKDP S I PDGTEGAAK IDVDVAVV
N. haematococca   KFTRLIKAEDREGIAESITNRAVERKVLRLRLKALTYGKDP S I PDGTEGAAK INVDVAVV
O. sinensis       KYTRLIKAADRQAIHSAITNAAVEQSIFERLR LKALTYGKDPAAPEGSEGP TKIDVDVAVV
C. purpurea       MYERLIKAEDREGIADSITNKAVEKSVLARLR LKAQTYGKDP SVADETDHAVK INVDVAVV
C. gloeosporioides KYTALIKAEDRDGIGAAITNAAVEKVLRLRLKCLTYGTDPS I GAGPENQAK IDADSVV
T. minima         LYTRLIKAEDREAIGEAIVNKAVEKVLRLRLKALTYGTDPS SAGVDSGDQSK INVDVAVV
Rosellinia sp     LYTRLIKAGDRDIGESITNAAVEKQVLARLR LKAQTYGTDPSSTNTTG-AGKINADAVE
: ** : :*. * . :*. * ***. : : **:* **.*** : **.*:*

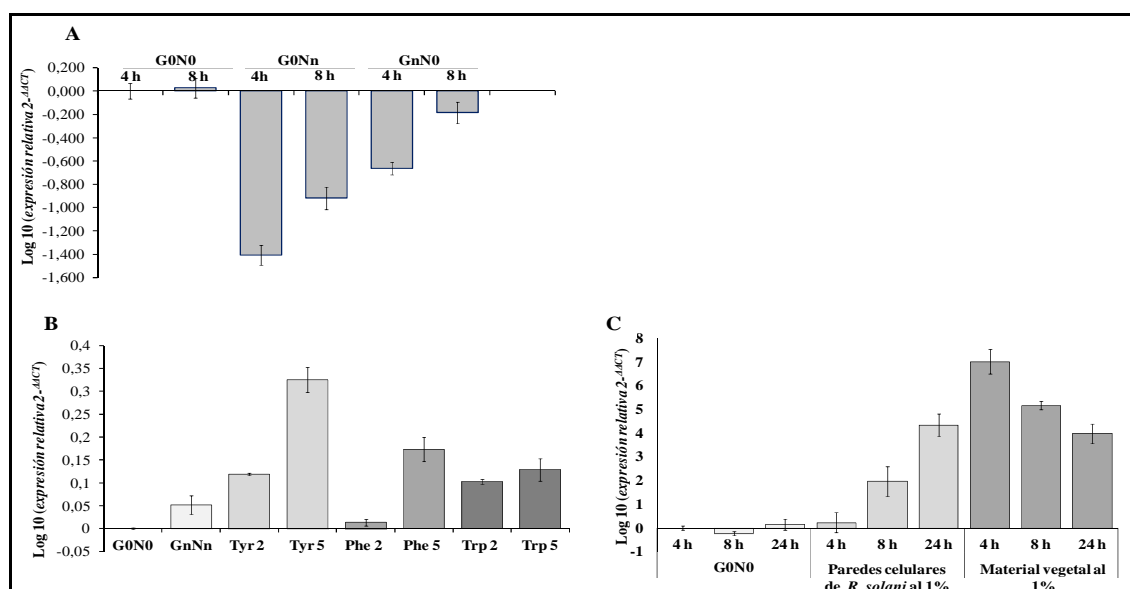
T. parareesei      SMYKDFVIPLTKEVEVEYLMQR L I PEE
T. reesei          SMYKDFVIPLTKEVEVEYLMQR L I PEE
T. virens         SMYRDFVIPLTKEVEVEYLMQR LL PEA
F. oxysporum      SMYKDFVIPLTKEVEVEYLMQR LE PSA
F. fujikuroi      SMYKDFVIPLTKEVEVEYLMQR LE PSA
N. haematococca   SMYKDFVIPLTKEVEVEYLMQR LE PAA
O. sinensis       AMYKDFVIPLTKEVEVEYLMQR LE PDA
C. purpurea       AMYEDFVIPLTKEVEVEYLMQR LE AEE
C. gloeosporioides ALYKDFVIPLTKEVEVEYLMQR LE PVE
T. minima         SMYENFVIPLTKDVEVEYLMQR LE ADN
Rosellinia sp     SMYRDFVIPITKEVEVEYLMQR LE ---
:*. :*****:***:*****

```

**Figura 16.** Alineamiento y comparación de TPCMUI con aquellas proteínas de bases de datos con las que presentaba mayor similitud de secuencia. Las posiciones conservadas se indican con un asterisco (\*). El alineamiento se llevó a cabo con el programa *ClustalX* (Thompson y col., 1994).

### 2.3. Estudio de expresión de *Tpcm1* en *T. parareesei* T6

La expresión del gen *Tpcm1* se analizó mediante *Real-time* PCR. Para ello se utilizó ADNc obtenido a partir de ARN total extraído de micelio de *T. parareesei* T6 crecido bajo distintas condiciones de cultivo (añadiendo distintos compuestos a un medio mínimo) durante 4, 8 o 24 horas, tal y como se describe en el apartado 4.2.6 de materiales y métodos. Las parejas de oligonucleótidos utilizadas para amplificar el *Tpcm1* y el gen de la *actina*, usado como control endógeno, se detallan en el apartado 8.3.4 de materiales y métodos. Se utilizaron condiciones de inducción relacionadas con la regulación por carbono, por nitrógeno y por producto final de la ruta del shikimato; y también, condiciones que simulaban situaciones de micoparasitismo (paredes celulares de *R. solani* al 1%) y de presencia de planta (material vegetal al 1%). Los perfiles de expresión de *Tpcm1* obtenidos bajo las diferentes condiciones de cultivo ensayadas se muestran en la Figura 17.



**Figura 17.** Análisis de expresión del gen *Tpcm1* de *T. parareesei* T6 mediante *Real-time* PCR. Se utilizó ADNc obtenido a partir de ARN total extraído de micelio de la cepa T6 crecida durante 4, 8 o 24 horas en medio MM (Penttilä y col., 1987), con déficit de glucosa y déficit de nitrógeno (G0N0), adicionado con distintos compuesto. A) 10 veces más de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (G0Nn) o glucosa al 2% (GnN0). B) 2 o 5 mM de Phe, 2 o 5 mM de Tyr, y 2 o 5 mM de Trp (24 horas). C) Paredes celulares de *R. solani* al 1% o material vegetal de plantas de tomate al 1%. Como control de carga se utilizó el gen de la actina. Se tomó como condición basal  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}=1$ , y los resultados se expresan como  $\log_{10}$  de la expresión relativa.

En todos los casos, los niveles de expresión están calculados respecto a aquellos obtenidos en un medio mínimo, es decir, un medio con déficit de carbono, glucosa al 0,5%, y déficit de nitrógeno, una cantidad diez veces menor de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (G0N0). Se observó una disminución de la expresión génica cuando se aumentaba la cantidad de amonio (G0Nn) o de glucosa (GnN0) en el medio de cultivo (Figura 17A), perfiles que indicarían represión por nitrógeno y represión por carbono; y, en ambos casos, la



represión disminuía a medida que estos compuestos iban siendo consumidos, ya que se observó mayor represión a las 4 que a las 8 horas de cultivo. Una adición al medio de cultivo de Phe, Tyr o Trp, compuestos finales de la ruta, inducía la expresión del gen. A su vez, la expresión del gen aumentaba al aumentar la concentración de algunos de estos tres compuestos en el medio (Figura 17B).

La adición al medio de paredes celulares de un patógeno o de material vegetal inducía la expresión del gen (Figura 17C). Sin embargo, los perfiles de expresión observados eran diferentes en ambas condiciones ya que en presencia de paredes del patógeno la inducción del gen aumentaba con el tiempo de cultivo desde 4 a 24 horas, mientras que en presencia de material vegetal la mayor expresión se observaba a las 4 horas y los niveles disminuían a medida que avanzaba el tiempo de cultivo.

### **3. OBTENCIÓN DE CEPAS DE *T. parareesei* SILENCIADAS EN EL GEN *Tpcm1***

El análisis funcional del gen *Tpcm1* de *T. parareesei* T6 se realizó mediante una aproximación de silenciamiento génico.

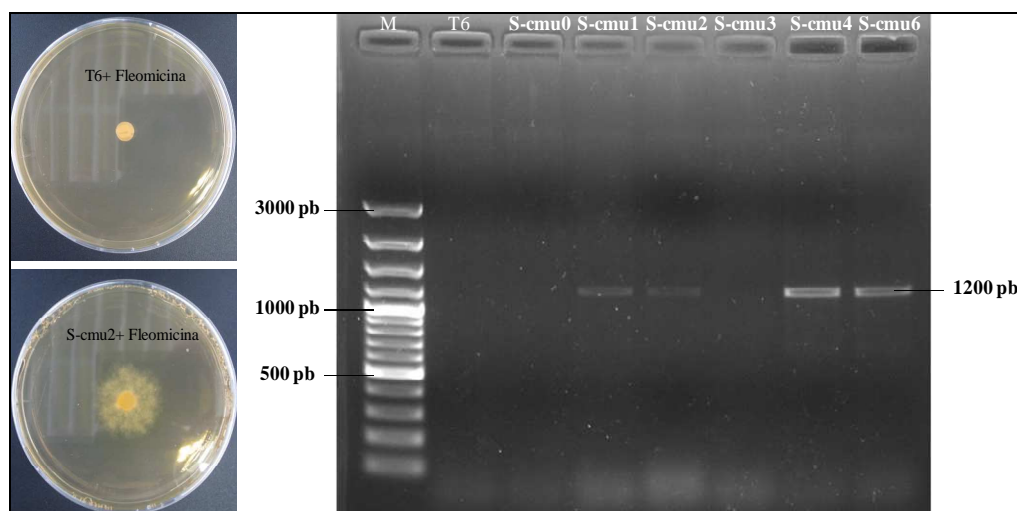
Para obtener cepas de *T. parareesei* T6 que silencian el gen que codifica la proteína TPCMU1, se llevó a cabo una transformación homóloga con el plásmido pJL43b1-Cmu1 (Figura 8). De manera resumida, se utilizó el plásmido pSIL (Sousa, 2004) para clonar, en orientaciones invertidas, un fragmento del gen *Tpcm1* de la cepa T6, y de esta forma generar horquillas de ARN complementario destinadas a silenciar el gen por interferencia de ARN. El *cassette* de expresión de este plásmido se clonó en el vector pJL43b1 para transformar los protoplastos. El proceso detallado de construcción del plásmido pJL43b1-Cmu1 se recoge en el apartado 5 de materiales y métodos.

El proceso de obtención de protoplastos y permeabilización de los mismos (Cardoza y col., 2006a) se detalla en el apartado 6.2 de materiales y métodos. En las transformaciones se utilizaron 10 µg del vector pJL43b1-Cmu1 o del plásmido pJL43b1, previamente linearizados con *KpnI*, para facilitar su integración en el genoma del hongo. Los 14 transformantes obtenidos se sometieron a sucesivas rondas de crecimiento en medio TSA selectivo (200 µg/mL de fleomicina) y no selectivo, y los 8 que mantuvieron su resistencia al antibiótico, se nombraron como S-cmu0 (transformante control) y S-cmu1 hasta S-cmu8, y se incluyeron en estudios posteriores.

#### **3.1. Comprobación y selección de transformantes**

En primer lugar, se analizó la integración de *cassette* de transformación en los 8 transformantes, 7 con el vector pJL43b1-Cmu1 y 1 con el plásmido vacío pJL43b1, que mantuvieron la resistencia a fleomicina tras tres pases sucesivos de crecimiento en

medio selectivo-no selectivo. Para ello, se extrajo ADN genómico de la cepa silvestre T6 y de los 8 transformantes, y se realizó una PCR para comprobar si llevaban el *cassette* de expresión (Figura 18). Se emplearon los oligonucleótidos TADIR2/IntR (Tabla 2 de materiales y métodos) que amplificaron un fragmento de 1200 pb, correspondiente a parte del intrón, el fragmento invertido de 500 pb del gen *Tpcm1* y parte del terminador del gen *cbh2*, en los transformantes S-cmu1, S-cmu2, S-cmu4, S-cmu6, S-cmu7 y S-cmu8. Mientras que no se observó amplificación cuando se utilizó como molde ADN de la cepa silvestre T6 o del transformante S-cmu0, este último obtenido por transformación con el plásmido vacío y utilizado como control.

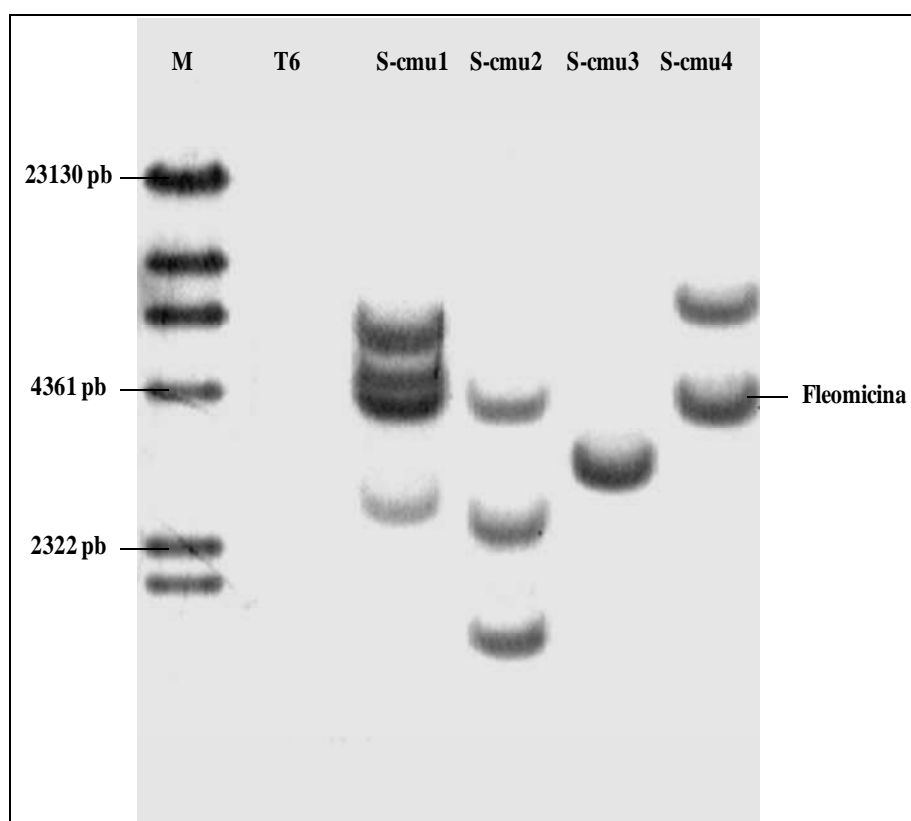


**Figura 18.** Selección y confirmación de transformantes. A la derecha, crecimiento de las cepas T6 y S-cmu2 en medio TSA con fleomicina 200 µg/mL tras 48 horas de cultivo a 28°C. A la izquierda, productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones de ADN genómico de 7 cepas de *T. parareesei*, identificadas en la parte superior de la imagen, con los oligonucleótidos TADIR2 y IntR. M: marcador XIV ADN ladder (Roche).

Se realizó un experimento tipo *Southern* para determinar el número veces que se había integrado el *cassette* de transformación en 7 de los transformantes (S-cmu1 hasta S-cmu8, excepto S-cmu5). Se utilizaron 20 µg de ADN genómico, obtenidos según se recoge en el apartado 7.2.3 de materiales y métodos, que se digirieron con la enzima *SacI*, que libera dos bandas, una de aproximadamente 4,5 kb que corresponde al *cassette* de fleomicina (sin diana para el enzima *SacI*), y otra de aproximadamente 3 kb del *cassette* pSIL-cmuFR. Como sonda se empleó el gen de resistencia a fleomicina (*ble*), amplificado y marcado con digoxigenina mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos BleR y BleF (Tabla 2) y las condiciones de amplificación que se detallan en el apartado 8.3.1.1 de materiales y métodos.

Tras hibridar y lavar la membrana, en condiciones restrictivas (65°C), se observaron entre 1 y 4 bandas en los carriles que contenían ADN de las cepas S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3, S-cmu4, S-cmu6, S-cmu7 y S-cmu8. Los cuatro modelos de

integración observados en los transformantes analizados se presentan en la Figura 19. Los transformantes S-cmu6, S-cmu7 y S-cmu8 presentaron un perfil de hibridación similar al observado para el transformante S-cmu4. Como era de esperar, no se observó banda de hibridación en los carriles que contenían ADN de la cepa silvestre T6 y se confirmó que todos los transformantes analizados mostraban inserciones del *cassette* de transformación. La banda de 4,5 kb correspondiente al *cassette* de fleomicina se observó a la altura esperada en todos los transformantes excepto en S-cmu3. La presencia de una o varias bandas de tamaño inferior a 4,5 kb en los transformantes S-cmu1, S-cmu2 y S-cmu3 sería indicativo de una o varias integraciones de solo una parte del *cassette* de fleomicina en esas cepas. En este punto, los transformantes S-cmu0 (como control), S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 se seleccionaron para ser incluidos en algunos estudios posteriores.



**Figura 19.** Análisis tipo *Southern* del gen *ble* en *T. parareesei* T6 y 4 transformantes (S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4). Se utilizaron 20  $\mu$ g de ADN genómico digerido con la enzima *SacI*. La hibridación se realizó en condiciones restrictivas y como sonda se empleó el gen de resistencia a fleomicina marcado con digoxigenina. M: marcador  $\lambda$ /*HindIII* (Roche).

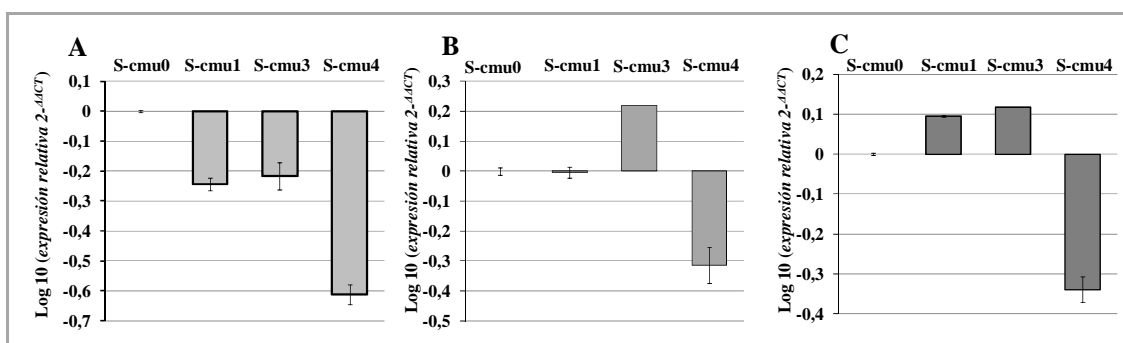
### 3.2. Análisis de expresión de *Tpcmu1* en los transformantes

Con objeto de determinar si la horquilla del fragmento del *Tpcmu*, presente en el vector pJL43b1-Cmu1 que se utilizó para transformar la cepa silvestre, autocomplementaba en el genoma de *T. parareesei* T6, analizamos los niveles de

transcrito en los transformantes S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4 crecidos bajo tres diferentes condiciones de cultivo. Para ello, se cuantificaron los niveles del transcrito mediante *Real-time* PCR, como se indica en el apartado 8.3.3 de materiales y métodos, utilizando ADNc obtenido a partir de ARN total extraído tras cultivar, separadamente, las cepas durante 24 horas y a 28°C en tres medios de cultivo diferentes: medio mínimo con glucosa al 2% (Penttilä y col., 1987) (GnNn), medio mínimo con glucosa al 0,5% (G0Nn) más 5 mM de Tyr y mínimo con glucosa al 0,5% (G0Nn) más 2 mM de Trp.

El ARN total se retrotranscribió utilizando el oligo(dT)<sub>15</sub>, como se indica en el apartado 8.3.2 de materiales y métodos. El cADN así generado, se utilizó como molde en reacciones de PCR que contenían la pareja de oligonucleótidos qPCR-cmuC/qPCR-cmuD, estos últimos diseñados sobre una zona del gen que no se utilizó en la construcción del vector pJL43b1-Cmu1. Los niveles de transcrito detectados para cada cepa y condición de cultivo están referidos a aquellos obtenidos en el transformante S-cmu0 (control de transformación).

Los resultados de expresión se presentan en la Figura 20. Los menores niveles de transcrito de *Tpcmu1* se observaron en la cepa S-cmu4 para los tres medios de cultivo ensayados. Sin embargo, la cepa S-cmu3 sólo mostró menores niveles de transcrito en el medio G0Nn mientras que para la cepa S-cmu1 se observaron niveles inferiores, no diferentes o superiores en función del medio de cultivo utilizado.



**Figura 20.** Expresión del gen *Tpcmu1* en los transformantes S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4 de *T. parareesei* T6. Las cepas se incubaron a 28°C durante 24 horas en: A) medio mínimo con glucosa al 2% (Penttilä y col., 1987), B) medio mínimo con glucosa al 0,5% y Tyr 5 mM, y C) medio mínimo con glucosa al 0,5% y Trp 2 mM. Como control de carga se utilizó el gen de la actina. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en el transformante S-cmu0 ( $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ ), y los resultados se expresan como  $\log_{10}$  de la expresión relativa.

### 3.3. Actividad corismato mutasa en los transformantes

Para determinar como el silenciamiento del gen *Tpcmu1* afectaba a la actividad corismato mutasa de *T. parareesei*, se analizó esta actividad en la cepa silvestre T6, el control de transformación S-cmu0 y los transformantes S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4 tras incubarlos, separadamente, durante 48 horas en cuatro medios de cultivo diferentes,

según se describe en el apartado 4.2.4 de materiales y métodos. Se obtuvieron proteínas intracelulares a partir de micelio obtenidos tras incubar las cepas en: medio mínimo con glucosa al 2% (Penttilä y col., 1987) y medio mínimo, con glucosa al 0,5%, más 5 mM de Phe, 5 mM de Tyr o 2 mM de Trp.

En la Tabla 7 se muestra la actividad corismato mutasa obtenida para las 5 cepas ensayadas tras aplicar el método descrito por Davidson y Hudson (1987), detallado en el apartado 9.2.1 de materiales y métodos, y expresada como actividad corismato mutasa específica (U/mg de proteína).

Los tres transformantes silenciados mostraron significativamente menores niveles de actividad corismato mutasa que la cepa S-cmu0, utilizada como control de transformación, en los tres medios de cultivo ensayados que contenían aminoácidos. Y de forma general, los menores niveles de actividad se observaron en el transformante S-cmu4 en los cuatro medios de cultivo. Exceptuando en el medio de cultivo con glucosa al 0,5% y 2 mM de Trp, el transformante control mostró significativamente mayores niveles de actividad que la cepa silvestre T6. Y el transformante S-cmu1 presentó una actividad superior al resto de las cepas analizadas en el medio de cultivo con glucosa al 2%.

**Tabla 7.** Actividad corismato mutasa específica (U/mg de proteína) detectada en proteínas intracelulares de la cepa silvestre *T. parareesei* T6 y los transformantes S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4, crecidos durante 48 horas en cuatro medios de cultivo diferentes.

Cepas	MM-G2%	Tyr 5 mM	Phe 5 mM	Trp 2 mM
T6	0,53±0,05 <sup>b</sup>	0,25±0,02 <sup>b</sup>	0,32±0,02 <sup>b</sup>	0,45±0,04 <sup>a</sup>
S-cmu0	0,55±0,06 <sup>b</sup>	0,57±0,08 <sup>a</sup>	0,64±0,01 <sup>a</sup>	0,29±0,05 <sup>b</sup>
S-cmu1	0,83±0,02 <sup>a</sup>	0,14±0,03 <sup>c</sup>	0,33±0,04 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>c</sup>
S-cmu3	0,40±0,01 <sup>c</sup>	0,03±0,01 <sup>d</sup>	0,17±0,03 <sup>c</sup>	0,08±0,00 <sup>c</sup>
S-cmu4	0,10±0,03 <sup>d</sup>	0,03±0,03 <sup>d</sup>	0,11±0,02 <sup>c</sup>	0,02±0,03 <sup>c</sup>

Los valores corresponden a la media de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Valores seguidos por diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey (P<0,05).

#### 4. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN *Tpcm1* EN EL CRECIMIENTO DE *T. parareesei* T6

##### 4.1. Crecimiento en diferentes medios de cultivo

Con objeto de analizar si el silenciamiento del gen *Tpcm1* afectaba al fenotipo de *T. parareesei*, se crecieron la cepa silvestre T6 y los transformantes S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4, ensayos descritos en el apartado 11.1.2 de materiales y métodos, en los medios de cultivos PDA, PPG, MEA, MS y MM-glucosa al 2%,

descritos en el apartado 3.2 de materiales y métodos. Para cada cepa y condición de cultivo se midieron los diámetros de crecimiento y se observó el mayor o menor grado de esporulación y de pigmentación del medio.

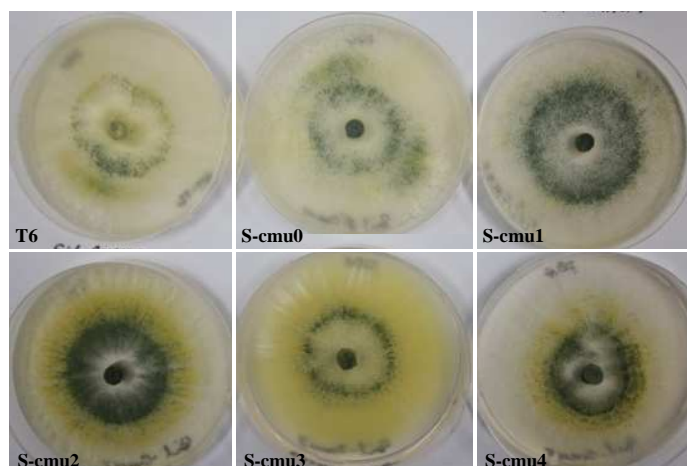
Los diámetros de crecimiento de las seis cepas tras 48 horas de incubación a 28°C en los 5 medios de cultivo ensayados se recogen en la Tabla 8. No se observaron diferencias significativas de crecimiento entre la cepa silvestre y la cepa control de transformación (S-cmu0) en ninguno de los cinco medios de cultivo ensayados. Los transformantes silenciados, excepto la cepa S-cmu3, no mostraron diferencias de crecimiento con la cepa control tras 48 horas de cultivo en PDA. Sin embargo, los cuatro transformantes crecieron significativamente menos que la cepa control en medio MS y, a su vez, mostrando diferencias significativas entre ellos, presentando la cepa S-cmu4 los menores diámetros de colonia. Las cepas S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 crecieron menos en los medios MEA y MM-glucosa 2%, siendo esas diferencias significativas respecto a la cepa control, mientras que en medio PPG los menores diámetros se observaron en la cepa S-cmu3 aunque el transformante S-cmu4 también presentó significativamente menos crecimiento que la cepa control.

**Tabla 8.** Diámetros de crecimiento de la cepa silvestre *T. parareesei* T6 y los transformantes S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4, tras 48 horas de incubación a 28°C en cinco medios de cultivo diferentes.

Cepas	PDA	PPG	MEA	MS	MM-glucosa2%
T6	8,5±0,0 <sup>a</sup>	8,5±0,0 <sup>a</sup>	8,5±0,0 <sup>a</sup>	8,5±0,0 <sup>a</sup>	8,5±0,0 <sup>a</sup>
S-cmu0	8,5±0,0 <sup>a</sup>	8,0±0,0 <sup>ab</sup>	8,4±0,0 <sup>a</sup>	8,4±0,0 <sup>a</sup>	8,2±0,1 <sup>ab</sup>
S-cmu1	8,5±0,0 <sup>a</sup>	8,1±0,5 <sup>ab</sup>	8,5±0,1 <sup>a</sup>	7,5±0,1 <sup>c</sup>	8,0±0,2 <sup>b</sup>
S-cmu2	8,5±0,0 <sup>a</sup>	7,5±0,5 <sup>bc</sup>	7,5±0,1 <sup>b</sup>	7,9±0,1 <sup>b</sup>	4,2±0,2 <sup>c</sup>
S-cmu3	8,0±0,0 <sup>b</sup>	5,4±0,6 <sup>d</sup>	7,0±0,1 <sup>bc</sup>	6,1±0,1 <sup>d</sup>	3,8±0,2 <sup>d</sup>
S-cmu4	8,2±0,0 <sup>ab</sup>	7,0±0,5 <sup>c</sup>	6,5±0,1 <sup>c</sup>	5,7±0,4 <sup>e</sup>	4,0±0,2 <sup>cd</sup>

Los valores corresponden a la media de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Para cada medio de cultivo, valores seguidos por diferentes letras en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey (P<0,05).

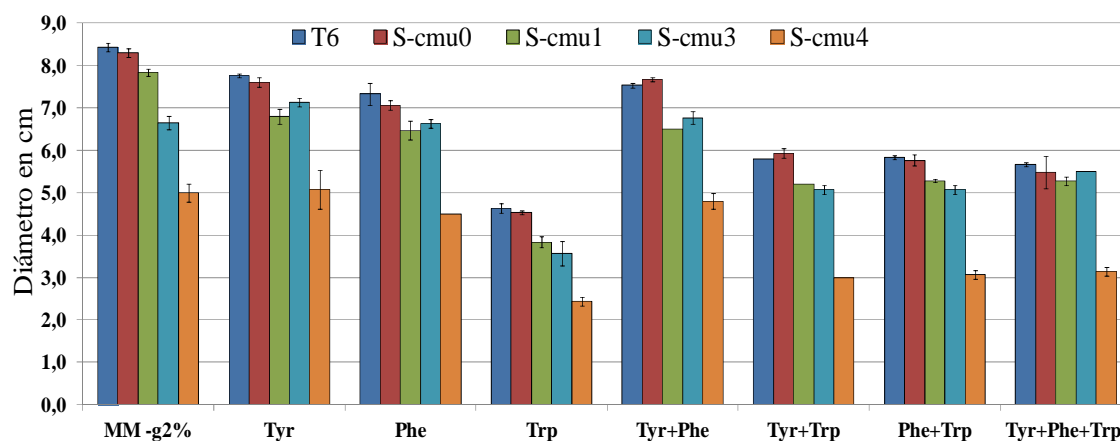
En cuanto a la pigmentación del medio y la esporulación de las distintas cepas de *T. parareesei*, los resultados variaron según el medio de cultivo utilizado. En general, se observó una mayor pigmentación de los medios y una mayor esporulación en las cepas silenciadas que en las cepas S-cmu0 o T6. En la Figura 21 se presenta una imagen con cultivos de las cepas, tras 48 horas de incubación en medio PDA, donde se puede apreciar la diferencia entre cepas en esas dos características fisiológicas.



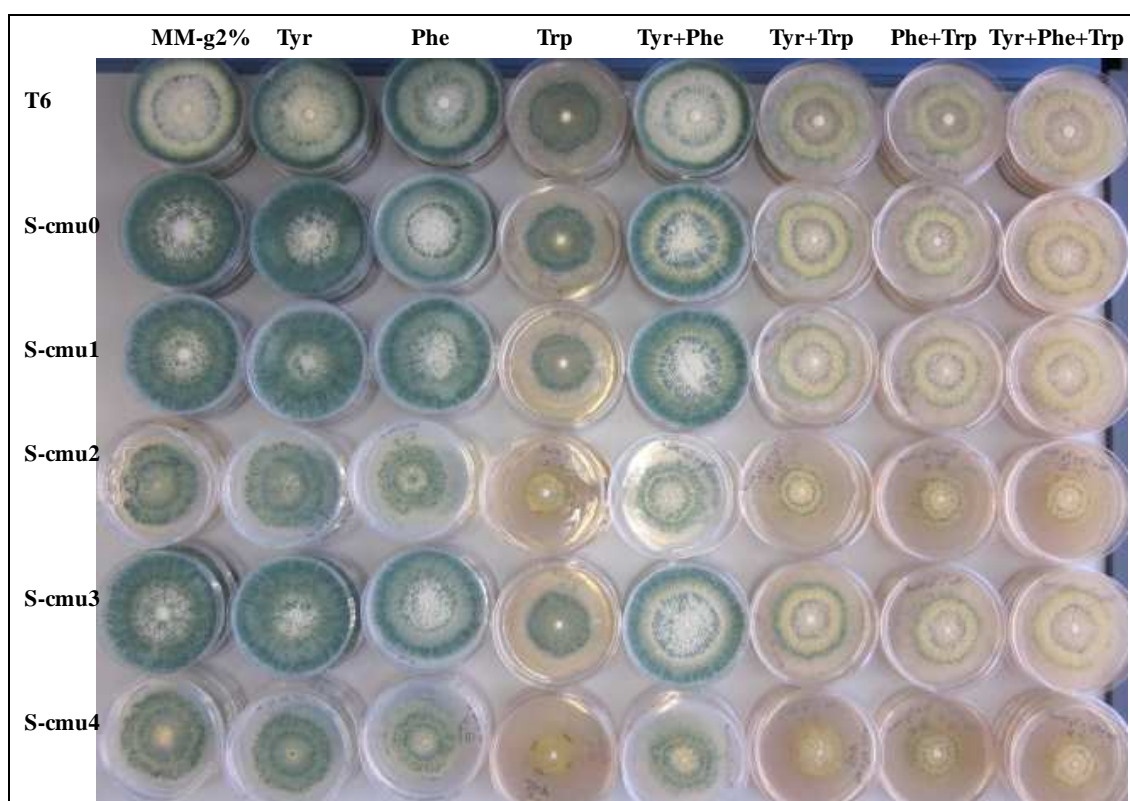
**Figura 21.** Fenotipo de la cepa silvestre *T. parareesei* T6 y los transformantes S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 tras 48 horas de incubación a 28°C en medio PDA.

Se llevó a cabo un ensayo de complementación para determinar si los menores diámetros de crecimiento observados en los transformantes silenciados respecto a los de la cepa S-cmu0, en varios de los medios utilizados, revertían al añadir compuestos finales de la ruta del shikimato al medio de cultivo. Las cepas se crecieron en un medio MM-glucosa al 2% adicionado con 10 mM de Phe, Tyr y/o Trp, o no (medio control), apartado 11.1.2 de materiales y métodos, y los diámetros de crecimiento se muestran en la Figura 22. Como se había observado en los ensayos previos, los transformantes silenciados S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4 crecieron significativamente menos que el transformante control S-cmu0 en MM-glucosa al 2%. Estos tres transformantes también crecieron significativamente menos que S-cmu0 cuando se añadieron separadamente al medio Tyr, Phe o Trp, y cuando se añadieron combinaciones de Tyr y Phe, Tyr y Trp o Phe y Trp. La suplementación del medio MM-glucosa al 2% con 10 mM Tyr, con 10 mM Phe y con 10 mM Trp, revertió el fenotipo observado en dos de los transformantes silenciados pues S-cmu1 y S-cmu3 no mostraron diferencias significativas de crecimiento con la cepa S-cmu0 en ese medio. Sin embargo, el transformante S-cmu4 siempre creció significativamente menos que cualquiera de las otras cepas, silvestre, control y transformantes silenciados, en cualquiera de los medios ensayados. El transformante S-cmu2 presentó, en todos los medios ensayados, diámetros de crecimiento y fenotipos similares a los observados en el transformante S-cmu4 (Figura 23). Como se puede apreciar en esa imagen, los transformantes S-cmu1 y S-cmu3 mostraron fenotipos similares entre ellos y también con la cepa control de transformación S-cmu0.

Además, la adición de Tyr o de Phe al medio de cultivo no causaba grandes cambios en el crecimiento de ninguna de las cepas ensayadas. Sin embargo, todas las cepas crecían menos, aproximadamente un 50%, cuando se añadía Trp al medio, siendo la disminución del crecimiento menos evidente cuando el Trp se combinaba con Tyr o Phe.



**Figura 22.** Diámetro de crecimiento en cm de las cepas T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4 de *T. parareesei* tras 7 días de incubación en un medio MM-glucosa al 2% suplementado o no (control) con Tyr, Phe, Trp y las posibles combinación entre ellos a una concentración final de 10 mM cada uno.



**Figura 23.** Fenotipo de las cepas T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4 de *T. parareesei* tras 7 días de incubación en un medio MM-glucosa al 2% suplementado o no (control) con Tyr, Phe, Trp y las posibles combinación entre ellos a una concentración final de 10 mM cada uno.

#### 4.2. Crecimiento a diferentes temperaturas

Con el objeto de determinar si el efecto del silenciamiento del gen *Tpcm1* sobre el crecimiento de las cepas de *T. parareesei* se veía afectado, a su vez, por la temperatura, la cepa T6, el control de transformación S-cmu0 y los transformantes S-



cmu1, S-cmu2 y S-cmu4 se crecieron durante 40 horas en medio PDA a tres temperaturas de incubación diferentes, 22, 28 y 37°C, como se describe en el apartado 11.1.3 de materiales y métodos.

Los diámetros de crecimiento de las cepas en medio PDA a tres temperaturas diferentes se recogen en la Tabla 9. Se observó de forma general que los transformantes S-cmu1, S-cmu2 y S-cmu4 mostraron significativamente menores diámetros de crecimiento que la cepa control S-cmu0 para las tres temperaturas de incubación testadas, mientras que la cepas control no mostró diferencias de crecimiento con la cepa silvestre. Destacar el comportamiento del transformante S-cmu1, que mostró menor crecimiento a 22° y no mostró diferencias a 28 o 37°C. También se observó que la cepa S-cmu1 mostraba un aspecto levaduriforme durante las primeras 24 horas de cultivo en PDA, independientemente de la temperatura de incubación utilizada, pero que a partir de las 48 horas de cultivo, los diámetros de colonia no diferían significativamente con los medidos en T6 o en S-cmu0.

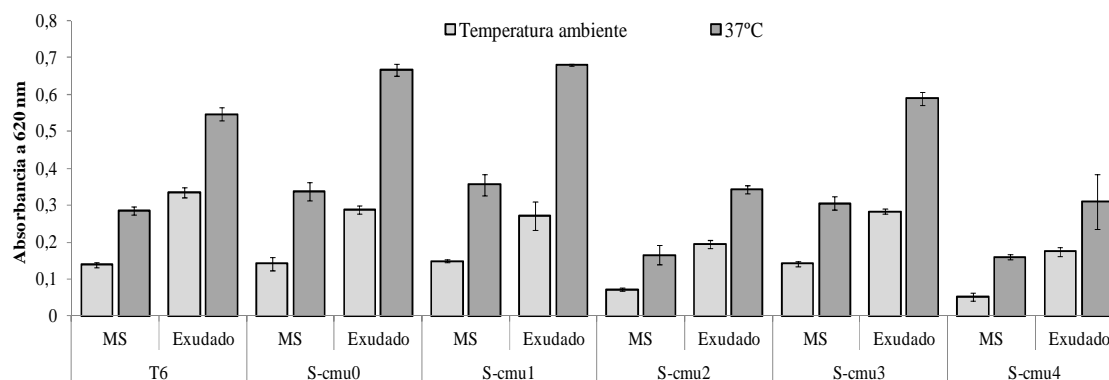
**Tabla 9.** Diámetros de crecimiento de la cepa silvestre *T. parareesei* T6 y los transformantes S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu2 y S-cmu4, tras 40 horas de incubación en PDA a diferentes temperaturas.

Cepa	Temperatura (°C)		
	22	28	37
T6	3,1±0,1 <sup>a</sup>	5,4±0,1 <sup>a</sup>	6,4±0,1 <sup>a</sup>
S-cmu0	3,0±0,3 <sup>a</sup>	5,4±0,1 <sup>a</sup>	6,3±0,1 <sup>a</sup>
S-cmu1	1,6±0,2 <sup>c</sup>	4,4±0,1 <sup>b</sup>	5,8±0,0 <sup>b</sup>
S-cmu2	2,3±0,1 <sup>b</sup>	4,3±0,1 <sup>b</sup>	5,5±0,1 <sup>c</sup>
S-cmu4	2,4±0,0 <sup>b</sup>	4,4±0,1 <sup>b</sup>	5,8±0,1 <sup>b</sup>

Los valores corresponden a la media de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Para cada temperatura, valores seguidos por diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey (P<0,05).

### 4.3. Crecimiento con exudados de planta

La capacidad de la cepa silvestre *T. parareesei* T6 y de los transformantes S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 para crecer en un medio líquido donde previamente se habían cultivado plantas de tomate se analizó mediante un ensayo en placa *microtiter*, según se describe en el apartado 11.1.4 de materiales y métodos. Se emplearon como medios de cultivo MS y MS+exudados de tomate, los valores de absorbancia medidos a 620 nm tras 48 horas de incubación de las placas *microtiter* a temperatura ambiente o a 37°C se recogen en la Figura 24.



**Figura 24.** Crecimiento de *T. parareesei* (cepa silvestre T6, cepa control de transformación S-cmu0, y transformantes silenciados S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4) en medio líquido MS o en MS con exudado de plantas de tomate a temperatura ambiente y a 37°C. Los datos se presentan como una media de tres réplicas de los valores de absorbancia a 620 nm tras 48 horas de incubación a dos temperaturas diferentes.

Se obtuvieron mayores valores de absorbancia para todas las cepas a las dos temperaturas ensayadas en el medio con exudados de tomate; y, a su vez, mayores valores a 37°C que a temperatura ambiente. De forma general se observa que las cepas S-cmu2 y S-cmu4 mostraron menores valores de absorbancia en MS y en MS con exudados a las dos temperaturas ensayadas, observándose las mayores diferencias con el resto de las cepas en el medio con exudados de tomate e incubaciones a 37°C. Los niveles de absorbancia detectados en cultivos de las cepas S-cmu1 y S-cmu3 fueron similares a los obtenidos para la cepa T6 y para la cepa control S-cmu0 cuando se incubaron bajo las mismas condiciones de cultivo.

## 5. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN *Tpcm1* EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN *T. parareesei*

### 5.1. Producción de SA en las diferentes cepas de *T. parareesei*

Con el objeto de determinar si el silenciamiento del gen *Tpcm1* afectaba a la producción de SA en *T. parareesei*, se analizó la cantidad de este compuesto en sobrenadantes de cultivo de medio PDB de las cepas T6, S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4, incubadas durante 48 horas a 30°C según se describe en el apartado 4.2.3 de materiales y métodos, y siguiendo la metodología descrita en el apartado 10.1 de esa sección.

La cantidad de SA detectada en sobrenadantes de las diferentes cepas, crecidas bajo idénticas condiciones de cultivo, se recogen en la Tabla 10. Se detectaron cantidades de SA significativamente menores en la cepa silvestre que en el control de transformación S-cmu0, mientras que no se detectaron diferencias en producción de SA entre S-cmu0 y el transformante silenciado S-cmu1. Los silenciados S-cmu3 y S-cmu4

produjeron significativamente menores cantidades de SA que el control de transformación S-cmu0.

**Tabla 10.** Cantidad de SA detectada en sobrenadantes de cultivo de 48 horas en medio PDB en cepas de *T. parareesei*.

Cepa	µg/mL
T6	2,55±0,12 <sup>b</sup>
S-cmu0	3,95±0,22 <sup>a</sup>
S-cmu1	3,86±0,05 <sup>a</sup>
S-cmu3	2,22±0,14 <sup>bc</sup>
S-cmu4	1,48±0,0 <sup>c</sup>

Los valores corresponden a la media de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Valores seguidos por diferentes letras en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey (P<0,05).

## 5.2. Producción de IAA y tirosol en las diferentes cepas de *T. parareesei*

Para evaluar si el silenciamiento del gen *Tpcm1* en *T. parareesei* afectaba a su capacidad para producir compuestos como SA, IAA y tirosol, se cuantificaron dichos compuestos en diferentes sobrenadantes de cultivo de los hongos, mediante cromatografía líquida HPLC. Se empleó espectrometría de masas para SA y IAA y cromatografía de gases masas para tirosol. El análisis de estos compuestos se realizó a partir de sobrenadantes de tres medios de cultivo diferentes: PDB, MM-glucosa al 2% y MM-glucosa al 2%+Tyr 5 mM+Phe 5 mM+Trp 2 mM, donde las cepas T6, S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4 fueron incubadas individualmente durante 48 horas a 30°C, según se indica en el apartado 10.2 de materiales y métodos.

No se detectó SA, mediante HPLC-MS, en ninguno de los tres sobrenadantes de cultivo analizados procedentes de cualquiera de las diferentes cepas de *T. parareesei* consideradas. De forma general (Tabla 11), no se observaron diferencias en la cantidad de IAA producido ni entre medios de cultivo ni entre cepas, en todos los casos se detectaron cantidades entre 0,01 y 0,03 mg/L de este compuesto. Y, la cantidad de tirosol detectada para cada una de las cepas ensayadas varió en función del medio de cultivo utilizado en su crecimiento (Tabla 11).

No se detectó tirosol en los sobrenadantes de cultivo del medio MM-glucosa al 2% de ninguna de las seis cepas analizadas, pero si el medio se suplementaba con aminoácidos, las cepas producían tirosol y la cantidad variaba según la cepa. Aunque se observaban grandes diferencias entre los niveles de tirosol producidos por las cepas T6 y S-cmu0 en este medio, se detectaron menores cantidades en los transformantes S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 que en la cepa control S-cmu0. También se detectó tirosol en sobrenadantes de cultivo en PDB para todas las cepas, en cantidades de 0,8 a 1,1 mg/L.

**Tabla 11.** Cantidades de IAA y de tirosol detectadas en sobrenadantes de cultivo de 48 horas de cepas de *T. parareesei* en los medio PDB, MM-glucosa al 2% (MMg-2) o MM-glucosa al 2%+Tyr 5 mM+Phe 5 mM+Trp 2 mM (MMg-2+aa).

Cepas	IAA (mg/L)			Tirosol (mg/L)		
	PDB	MMg-2	MMg-2+aa	PDB	MMg-2	MMg-2+aa
T6	0,02	0,02	0,03	0,8	n.d.	6,7
S-cmu0	0,03	0,03	0,04	0,8	n.d.	13,4
S-cmu1	0,03	0,02	0,01	1,0	n.d.	13,5
S-cmu2	Sin dato	0,02	0,04	Sin dato	n.d.	n.d.
S-cmu3	0,02	0,02	0,02	1,0	n.d.	11,8
S-cmu4	0,03	0,02	0,03	1,1	n.d.	8.2

n.d.: no detectado

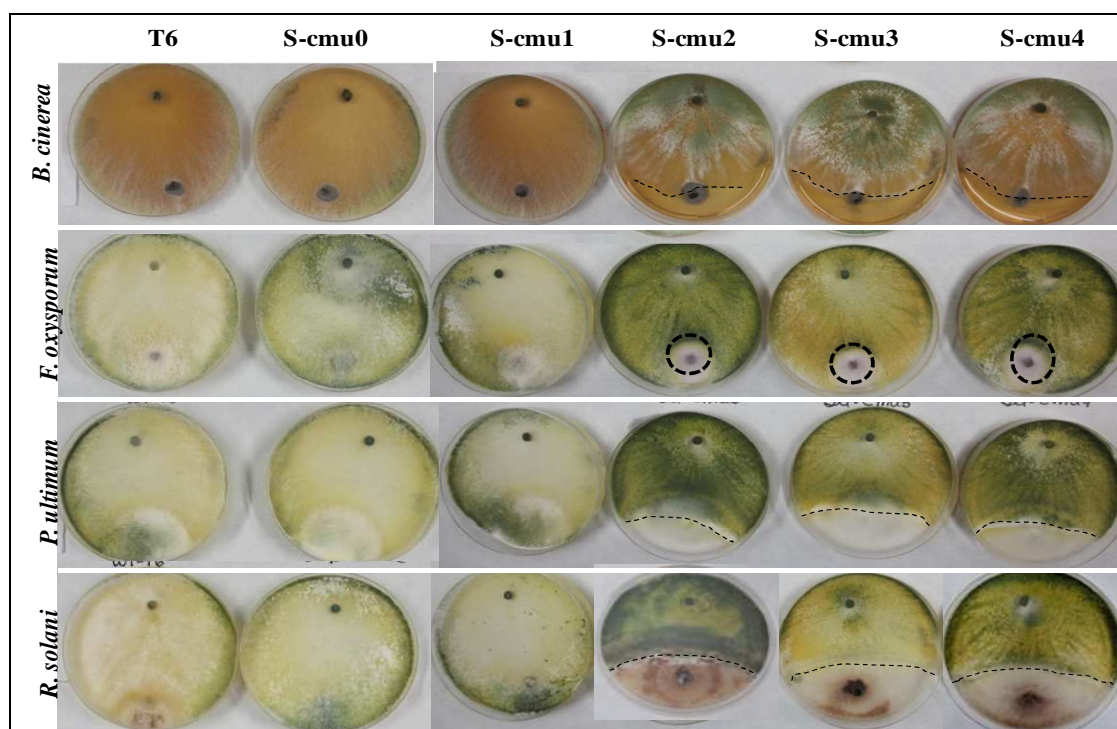
## 6. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN *Tpcm1* EN LAS PROPIEDADES ANTAGONISTAS DE *T. parareesei*

Con el objeto de investigar si el silenciamiento del gen *Tpcm1* en *T. parareesei* afectaba a su capacidad antagonista, se analizó la habilidad de la cepa silvestre T6 y de los transformantes S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 para inhibir el crecimiento de cuatro patógenos, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. ultimum* y *R. solani*. Se utilizaron enfrentamientos duales y ensayos sobre membrana.

### 6.1. Actividad antagonista en cultivo dual

La capacidad antagonista de la cepa silvestre T6, del transformante control y de los transformantes silenciados en el gen *Tpcm1* se evaluó, a temperatura ambiente, frente a *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. ultimum* y *R. solani*, mediante ensayos de enfrentamiento en cultivo dual (apartado 12.1 de materiales y métodos). En la Figura 25 se muestran cultivos duales de 10 días de las diferentes cepas con cada uno de los 4 patógenos ensayados.

De forma general y frente a los cuatro patógenos utilizados, las cepas T6, S-cmu0 y S-cmu1, muestran un comportamiento similar entre ellas, y, presentaron mayor capacidad antagonista que aquella observada en las cepas S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4. Las tres primeras sobrecrecieron las colonias de los cuatro patógenos, mostrando la mayor actividad frente a *B. cinerea*. Los transformantes S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 no sobrecrecieron completamente la colonia de ninguno de los 4 patógenos, mostrando la menor actividad frente a *P. ultimum* y *R. solani*. Sin embargo, la cepa S-cmu3 mostró, a su vez, menor capacidad micoparasítica frente a *P. ultimum* que S-cmu2 y S-cmu4. Por otro lado, los silenciados S-cmu2 y S-cmu4 mostraron mayor grado de esporulación en cultivo dual con cada uno de los cuatro patógenos, mientras que para la cepa S-cmu3 se observaba solamente en los cultivos frente a *B. cinerea*.



**Figura 25.** Cultivos duales de las cepas T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 de *T. parareesei* frente a los patógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. ultimum* y *R. solani*, después de 10 días de cultivo en medio PDA o MEA (para *B. cinerea*).

## 6.2. Actividad antagonista en cultivos sobre membrana

Con objeto de determinar si el gen *Tpcm1* de *T. parareesei* se relacionaba con la producción de compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de fitopatógenos, la cepa silvestre T6, el transformante control y los transformantes silenciados se evaluaron frente a los patógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. ultimum* y *R. solani* en ensayos sobre membrana, según se describe en el apartado 12.2 de materiales y métodos. Se utilizaron dos tipos de membrana: celofán, con tamaño de poro de aproximadamente 90 kDa, por el que pasan todo tipo de proteínas y metabolitos; y celulosa, con tamaño de poro de 14 kDa, por la que teóricamente solo pasarían los compuestos de bajo peso molecular.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento de los patógenos en medios donde previamente se habían crecido las diferentes cepas de *T. parareesei*, y expresados respecto al crecimiento observado en sus respectivos controles, se recogen en las Tablas 12 (celofán) y 13 (celulosa).

En los ensayos realizados sobre celofán, las cepas T6 y S-cmu0 mostraron similares porcentajes de inhibición frente a *F. oxysporum*, *R. solani* y *P. ultimum*, inhibiendo completamente el crecimiento de este último. Sin embargo, se observaron grandes diferencias entre cepas, independientemente del silenciamiento del gen *Tpcm1*, frente a *B. cinerea*. Los cuatro silenciados mostraron menor capacidad

inhibitoria de *P. ultimum*, tres de ellos (S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4) de *R. solani*, dos de ellos de *F. oxysporum* (S-cmu2 y S-cmu4) y solo S-cmu4 presentó menor actividad frente a *B. cinerea*.

**Tabla 12.** Actividad antagonista de cepas de *T. parareesei* (cepa silvestre T6, cepa control de transformación S-cmu0, y transformantes silenciados S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4) frente a cuatro fitopatógenos en ensayos sobre membrana de celofán.

Cepa	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>R. solani</i>
T6	54,9±0,7	28,3±0,4	100,0±0,0	24,0±0,0
S-cmu0	74,7±0,2	28,1±0,4	100,0±0,0	24,0±0,2
S-cmu1	56,2±0,6	25,2±0,1	29,1±0,2	24,0±0,1
S-cmu2	72,8±0,2	16,5±0,3	57,7±1,3	2,0±0,2
S-cmu3	81,8±0,2	26,2±0,3	28,8±0,5	11,0±0,1
S-cmu4	14,2±0,5	16,0±0,1	13,8±0,8	2,0±0,1

Los valores son media de tres replicas biológicas.

De forma general, las cepas de *T. parareesei* presentaron menor inhibición de crecimiento de tres de los patógenos ensayados, excepto *B. cinerea*, en los ensayos realizados sobre celulosa que en los de celofán. Las cepas T6 y S-cmu0 mostraron similares porcentajes de inhibición de *R. solani* y *P. ultimum*, pero la cepa control mostró un porcentaje de inhibición un 10% más alto que la cepa silvestre frente a *F. oxysporum* o *B. cinerea*. Por tanto, los menores porcentajes de inhibición de *B. cinerea* o de *F. oxysporum* observados en los transformantes silenciados no podrían asociarse a un efecto del silenciamiento génico. En ensayos sobre celulosa, los cuatro transformantes silenciados mostraron menor capacidad inhibitoria de *P. ultimum* y *R. solani*, siendo este hecho más evidente para las cepas S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4.

**Tabla 13.** Actividad antagonista de cepas de *T. parareesei* (cepa silvestre T6, cepa control de transformación S-cmu0, y transformantes silenciados S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4) frente a cuatro fitopatógenos en ensayos sobre membrana de celulosa de tamaño de poro 14 kDa.

Cepa	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>R. solani</i>
T6	69,8±0,3	19,9±0,1	47,4±0,3	21,2±0,0
S-cmu0	80,6±0,1	28,3±0,3	49,1±0,0	21,2±0,2
S-cmu1	62,9±0,2	15,8±0,1	21,8±0,1	17,2±0,1
S-cmu2	52,6±1,2	15,8±0,1	11,8±1,1	1,2±0,2
S-cmu3	65,6±0,4	24,7±0,2	11,8±1,2	7,8±0,2
S-cmu4	69,1±0,4	sin datos	0,0±0,0	3,1±0,1

Los valores son media de tres replicas biológicas.

### 6.3. Actividades hidrolíticas

Para determinar si el silenciamiento del gen *Tpcmu1* de *T. parareesei* afectaba a la producción de enzimas hidrolíticas (quitinasa, proteasa y celulasa) en el hongo, se determinaron estas actividades en extractos proteicos intracelulares de la cepa silvestre T6, el control de transformación S-cmu0 y los transformantes S-cmu1, S-cmu2, Scmu3 y S-cmu4. Las proteínas se extrajeron, según se describe en el apartado 9.1 de materiales y métodos, de micelios procedentes de cultivos de 48 horas en medio PDB suplementado con paredes celulares de *R. solani* al 0,5%, crecidas como se detalla en el apartado 4.2.4 de materiales y métodos.

En la Tabla 14 se recogen las actividades quitinasa, proteasa y celulasa, determinadas según los protocolos que se describen en los apartados 9.2.2, 9.2.3 y 9.2.4 de materiales y métodos, respectivamente, y expresadas como unidades de actividad por mg de proteína. Bajo la condición en que se cultivaron las cepas, se detectaron actividad quitinasa, proteasa y celulasa en todas las cepas de *T. parareesei* ensayadas. Para cada una de las tres actividades analizadas, no se detectaron diferencias entre las cepas T6 y S-cmu0. El transformante S-cmu4 mostró significativamente menores actividades quitinasa y proteasa que el resto de cepas ensayadas pero no difirió en los valores de actividad celulasa con la cepa silvestre o el control de transformación. La mayor actividad celulasa se detectó en el transformante S-cmu2, siendo significativamente mayor que aquella medida para el control de transformación, pero los transformantes S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4 no mostraron diferencias con las cepas T6 y S-cmu0.

**Tabla 14.** Actividades quitinasa, proteasa y celulasa específicas (U/mg de proteína), medidas en proteínas intracelulares de la cepa silvestre *T. parareesei* T6 y los transformantes S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4.

Cepas	Quitinasa	Proteasa	Celulasa
T6	0,7±0,1 <sup>b</sup>	1,4±0,1 <sup>a</sup>	0,18±0,01 <sup>b</sup>
S-cmu0	0,7±0,1 <sup>b</sup>	1,3±0,2 <sup>a</sup>	0,18±0,00 <sup>b</sup>
S-cmu1	0,9±0,1 <sup>a</sup>	1,4±0,0 <sup>a</sup>	0,19±0,01 <sup>b</sup>
S-cmu2	0,6±0,1 <sup>b</sup>	1,0±0,3 <sup>ab</sup>	0,24±0,01 <sup>a</sup>
S-cmu3	0,6±0,0 <sup>b</sup>	1,2±0,5 <sup>a</sup>	0,18±0,01 <sup>b</sup>
S-cmu4	0,4±0,1 <sup>c</sup>	0,6±0,2 <sup>b</sup>	0,20±0,02 <sup>b</sup>

Los valores corresponden a la media de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Valores seguidos por diferentes letras en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 7. PAPEL DEL GEN *Tpcm1* DE *T. parareesei* EN LA COLONIZACIÓN DE RAÍCES DE TOMATE POR EL HONGO

Con el objeto de analizar el papel del gen *Tpcm1* de *T. parareesei* en la colonización de raíces de tomate, se evaluó esa habilidad en la cepa silvestre T6, el transformante control y los silenciados S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4, utilizando plantas de tomate crecidas en cultivo hidropónico y según se describe en el apartado 13.2 de materiales y métodos. Para cada cepa, se recogieron raíces de tomate de plantas de 10 días a las que se habían aplicado, 48 horas antes,  $10^5$  germínulas de *T. parareesei*, se extrajo ADN, según apartado 7.3 de materiales y métodos, y se cuantificó la cantidad de ADN del hongo y de ADN de la planta mediante *Real-time* PCR absoluta, utilizando dos rectas patrón obtenidos a partir de cantidades de ADN conocidas de cada uno de los organismos.

La capacidad de colonización de raíces de tomate por las diferentes cepas de *T. parareesei*, expresada como una proporción del hongo respecto a planta, se recoge en la Tabla 15. No se observaron diferencias significativas en la capacidad para colonizar raíces de tomate entre las cepas T6 y S-cmu0. Los transformantes silenciados S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 presentaron menor capacidad colonizadora que la cepa silvestre o el control de transformación, siendo la reducción de capacidad colonizadora superior a un 50% en esas cepas respecto al control. Sin embargo, el transformante S-cmu1 aunque presentó menor capacidad colonizadora de tomate que el control de transformación, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

**Tabla 15.** Capacidad colonizadora de raíces de tomate de la cepa silvestre *T. parareesei* T6 y los transformantes S-cmu0 (control), S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4. Las cantidades de hongo y planta y su proporción se obtuvieron mediante *Real-time* PCR utilizando plantas de tomate crecidas en cultivo hidropónico e inoculadas, 48 horas antes, con  $10^5$  germínulas del hongo.

Cepas	<i>actina</i> tomate			<i>actina Trichoderma</i>			Proporción
	Ct	DS	Cant <sup>*</sup>	Ct	DS	Cant <sup>**</sup>	
T6	20,82	0,06	144,52	16,87	0,02	24,58	0,17±0,01 <sup>a</sup>
S-cmu0	20,97	0,02	127,65	17,01	0,18	22,07	0,17±0,03 <sup>a</sup>
S-cmu1	21,78	0,04	67,82	18,07	0,16	10,13	0,15±0,01 <sup>a</sup>
S-cmu2	21,45	0,02	87,54	18,89	0,09	5,54	0,06±0,01 <sup>b</sup>
S-cmu3	21,04	0,10	121,25	18,43	0,31	7,74	0,06±0,02 <sup>b</sup>
S-cmu4	21,78	0,09	67,43	18,93	0,03	5,38	0,08±0,01 <sup>b</sup>

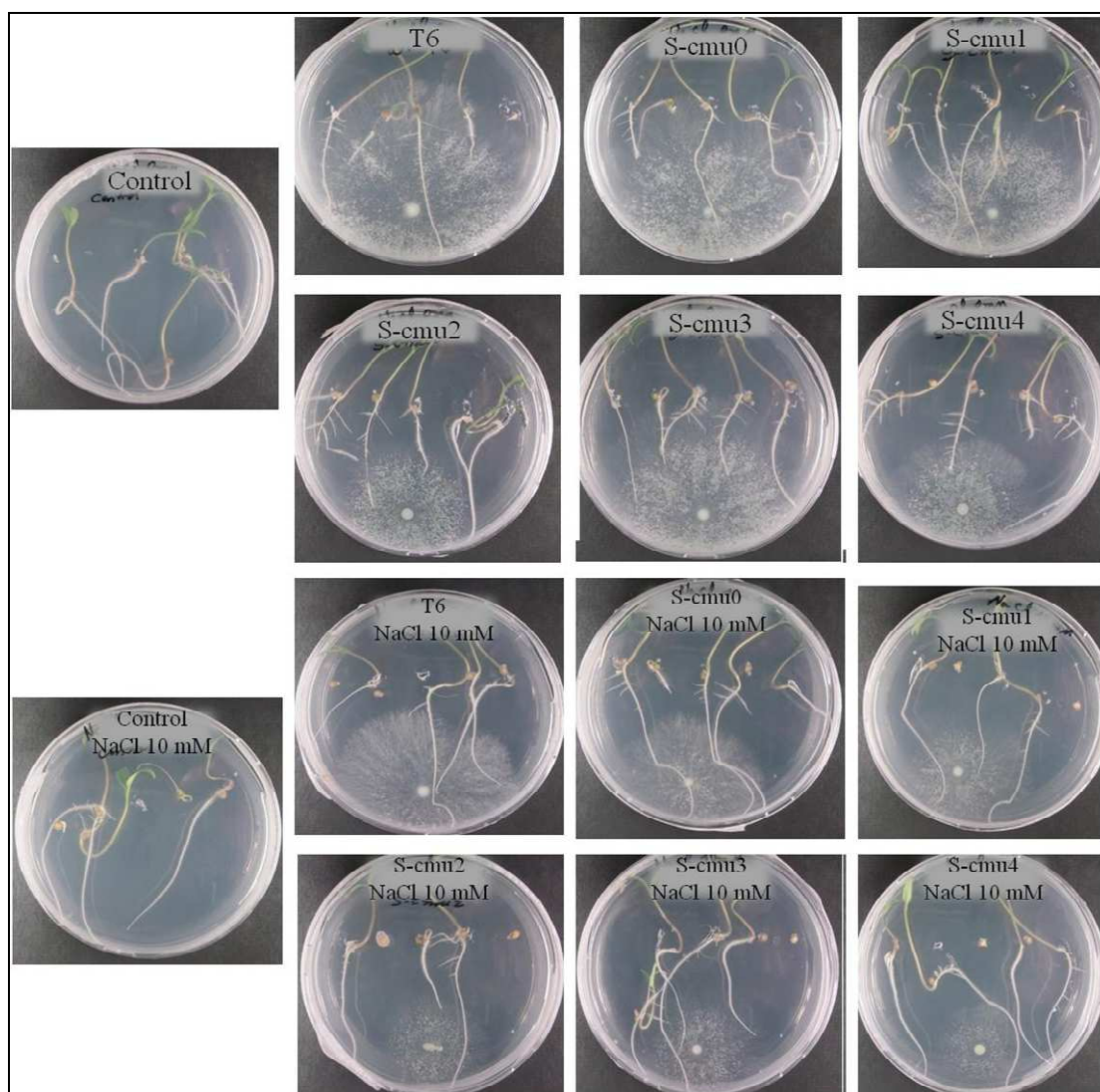
Ct, *threshold*; DS, desviación estándar; \*, cantidad de ADN de tomate en ng; \*\*, cantidad de ADN del hongo en ng; Proporción: cantidad de hongo/cantidad de planta. Los valores corresponden a la media de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Valores seguidos por diferentes letras en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey (P<0,05).



## 8. RESPUESTAS DE PLANTAS DE TOMATE AL SILENCIAMIENTO DE *Tpcm1* EN *T. parareesei* EN INTERACCIONES HONGO-PLANTA

### 8.1. Efecto de *T. parareesei* y del silenciamiento de *Tpcm1* en el desarrollo de plántulas de tomate en ensayos *in vitro*

Se analizó el efecto que *T. parareesei*, así como, el silenciamiento del gen *Tpcm1* en el hongo, provocaban en el desarrollo de plántulas de tomate mediante ensayos *in vitro*, según se describe en el apartado 13.1.1 de materiales y métodos. A plántulas de 3 días, crecidas *in vitro* en ausencia o presencia de un estrés salino (10 mM NaCl), se aplicó o no *T. parareesei*, y cultivos de esas interacciones se fotografiaron después de 2 días (Figura 26).



**Figura 26.** Efecto de diferentes cepas de *T. parareesei* en el desarrollo y la arquitectura de la raíz de plántulas de tomate. Plantas crecidas durante 3 días en medio MS (para superior de la imagen) o MS+10 mM NaCl (parte inferior de la imagen) e inoculadas con agua (control) o con 200 conidios de las cepas T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 o S-cmu4. La fotografía se tomó 2 días después de inocular el hongo.

En ausencia del estrés salino (parte superior de la Figura 26), las plántulas de tomate de las placas control (donde no se inoculó hongo) presentaron menor tamaño en la parte aérea, mayor longitud de raíz principal y menor número y tamaño de raíces laterales que las plántulas de placas donde se había aplicado cualquiera de las cepas de *T. parareesei*. A su vez, las plántulas de placas donde se aplicaron la cepa T6, S-cmu0 o S-cmu1 mostraron mayor longitud de raíz principal y menor número y tamaño de raíces laterales que las plántulas de placas que se habían sido inoculadas con la cepa S-cmu2, S-cmu3 o S-cmu4. Y excepto para alguna que otra plántula de la placa, el mayor número y tamaño de raíces laterales se observó en plántulas donde se había aplicado los transformantes S-cmu2 o S-cmu4

En presencia de un estrés salino (parte inferior de la Figura 26), no se observaron cambios en el tamaño de la parte aérea de la planta que se puedan asociar con la presencia o ausencia de una determinada cepa de *T. parareesei* y, únicamente, se observó un mayor tamaño de raíz principal en las plántulas tratadas con las cepas T6, S-cmu0 o S-cmu1 respecto a las plántulas control.

## **8.2. Efecto del sobrenadante fúngico en la germinación de semillas y en el desarrollo de plántulas de tomate en ensayos *in vitro***

Para evaluar el efecto del sobrenadante de las diferentes cepas de *T. parareesei* en la germinación de semillas y en el desarrollo de plántulas de tomate, se utilizaron ensayos *in vitro* en los que se añadieron distintas cantidades de sobrenadante de cultivo del hongo al medio donde se crecían las plantas de tomate, según se describe en el apartado 13.1.2 de materiales y métodos. La incorporación de 10 o de 25 mL de sobrenadante de cualquiera de las cepas utilizadas provocó efectos negativos en la germinación de las semillas de tomate, no observándose diferencias entre cepas de *T. parareesei* respecto a este parámetro para ambas cantidades de sobrenadante. Tampoco se observaron diferencias significativas en la longitud de la parte aérea de plantas control (ausencia de sobrenadante) y plantas crecidas con sobrenadante de las cepas silvestre o control de transformación.

No se observaron diferencias en los porcentajes de germinación de semillas de tomate, aproximadamente un 97%, a los 5 días de sembrarlas en un medio de cultivo al que se había añadido o no (control) 2 mL de cualquiera de los sobrenadantes fúngicos ensayados. El tamaño, parte aérea y raíz, de plántulas de tomate crecidas durante 10 días en un medio adicionado o no con 2 mL de sobrenadante fúngico se recogen en la Tabla 16.

No se observaron diferencias significativas en la longitud de raíz de plántulas de tomate crecidas en presencia o no de sobrenadante de las diferentes cepas. Las plántulas crecidas en presencia de sobrenadante del transformante S-cmu3 presentaron un menor

tamaño que el resto, pero las diferencias no fueron significativas respecto los obtenidos en plántulas crecidas con sobrenadante del control de transformación.

**Tabla 16.** Tamaño de parte aérea y de raíz principal de plántulas de tomate crecidas durante 10 días en un medio MS suplementado o no (control) con 2 mL de sobrenadante de cultivo de las cepas *T. parareesei* T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4.

Tratamiento	Longitud parte aérea (cm)	Longitud de raíz (cm)
Control	3,2±0,7 <sup>ab</sup>	4,3±0,4 <sup>a</sup>
T6	3,3±0,5 <sup>ab</sup>	4,6±1,0 <sup>a</sup>
S-cmu0	2,9±0,5 <sup>bc</sup>	4,4±0,7 <sup>a</sup>
S-cmu1	3,0±0,6 <sup>bc</sup>	4,5±0,8 <sup>a</sup>
S-cmu3	2,8±0,6 <sup>c</sup>	4,4±0,7 <sup>a</sup>
S-cmu4	3,5±0,4 <sup>a</sup>	4,5±0,5 <sup>a</sup>

Los valores son media de 31 plántulas con su respectiva desviación estándar. Valores seguidos por diferentes letras en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Un ejemplo de los fenotipos observados en las plántulas de tomate crecidas durante 10 días en un medio adicionado o no con 2 mL de sobrenadante de las diferentes cepas de *T. parareesei* se presenta en la Figura 27. En la parte inferior de la imagen se refleja la abundancia de raíces laterales en las plántulas de cada condición, según una escala previamente establecida. Las plántulas crecidas en un medio adicionado con sobrenadante del transformante S-cmu4 presentaron raíces laterales más largas y en mayor abundancia que plántulas crecidas con sobrenadante del control de transformación o del transformante S-cmu1.



**Figura 27.** Plántulas de tomate crecidas durante 10 días en MS adicionado o no (control) con 2 mL de sobrenadante de cultivo de las cepas *T. parareesei* T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu3 o S-cmu4. Control son plantas sin sobrenadantes. Los signos + de la parte inferior de la imagen indican la mayor o menor abundancia de raíces laterales en las plántulas.

### 8.3. Efecto de *T. parareesei* y del silenciamiento de *Tpcm1* en plantas de tomate en ensayos *in vivo*

#### 8.3.1. Desarrollo y respuesta a sal

Para analizar las respuestas de plantas de tomate al tratamiento con *T. parareesei* y al silenciamiento del gen *Tpcm1*, en ausencia o presencia de un estrés salino, a distintos tiempos de aplicar el hongo (5 ó 15 días), se utilizaron plantas de 2 semanas crecidas bajo condiciones de invernadero e inoculadas o no (control) con 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de *T. parareesei* T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, Scmu3 o S-cmu4 y, 15 días más tarde, sometidas durante dos semanas a un estrés salino o no. A las dos semanas de aplicar la cepa de *T. parareesei* o no, control, se comenzó un riego, en días alternos, con 5 mL de NaCl 200 mM por planta o no, control de sal, y se midieron parámetros como la altura y el grado de clorosis (en la condición de riego con sal) en 12 plantas de tomate de cada una de las condiciones ensayadas. Y en otro ensayo (8 plantas por condición), a los 5 días de inocular la cepa de *T. parareesei* o no control, se aplicó una lámina de 2 L de NaCl 300 mM en el contenedor de las macetas, y a los 15 días se evaluaron la clorosis y la caída de hoja.

La altura de las plantas de tomate sometidas a los diferentes tratamientos con *T. parareesei*, bajo estrés salino de 200 mM NaCl o no, se recogen en la Tabla 17.

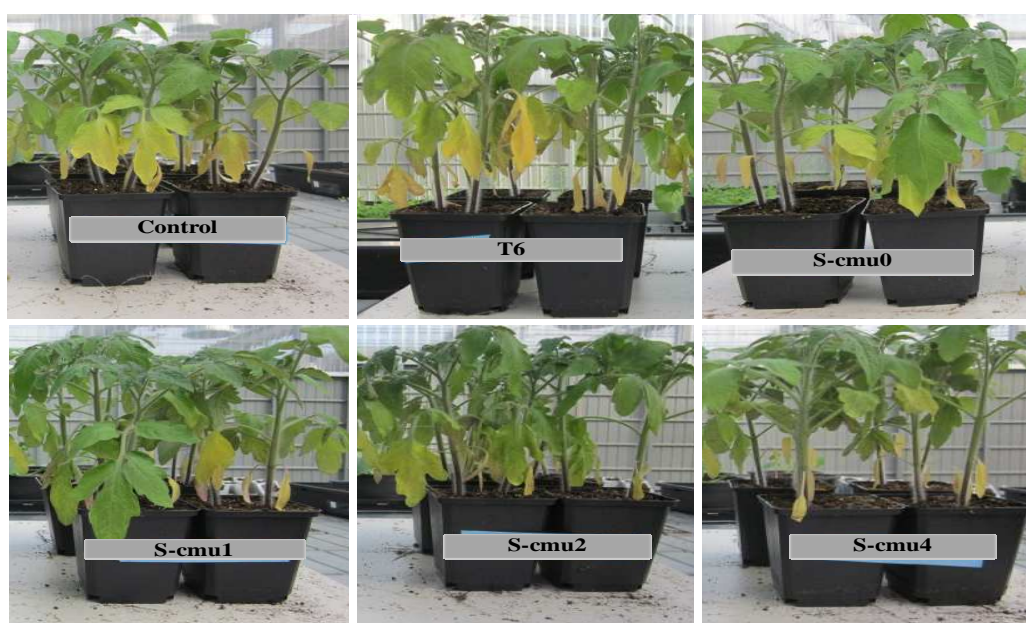
**Tabla 17.** Altura, en cm, de plantas de tomate de 6 semanas, tratadas 4 semanas antes con agua o con 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de *T. parareesei* (T6, control S-cmu0 o transformantes S-cmu1, S-cmu2 y S-cmu4), y regadas las últimas dos semanas, en días alternos, con agua o con 5 mL de NaCl 200 mM por planta (sal).

Condición	Riego con sal	Riego con agua
Agua	13,3±0,8 <sup>b</sup>	19,8±1,3 <sup>b</sup>
T6	14,2±1,2 <sup>a</sup>	21,2±1,4 <sup>a</sup>
S-cmu0	14,1±1,1 <sup>a</sup>	21,0±0,9 <sup>a</sup>
S-cmu1	14,0±0,9 <sup>a</sup>	20,0±0,8 <sup>a</sup>
S-cmu3	14,1±1,0 <sup>a</sup>	21,1±0,8 <sup>a</sup>
S-cmu4	14,0±0,7 <sup>a</sup>	20,9±0,9 <sup>a</sup>

Los valores son media de 12 plantas con su respectiva desviación estándar. Valores seguidos por diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey (P<0,05).

En todos los casos, las plantas presentaron mayor altura en la condición riego con agua que en la condición de estrés salino. A su vez, las plantas inoculadas con cualquiera de las cepas de *T. parareesei* ensayadas mostraron significativamente mayor altura que las plantas no inoculadas (control), tanto en la condición de riego con agua como en la del estrés salino. No se observaron diferencias significativas en altura entre plantas inoculadas con una cepa silenciada de *T. parareesei* y las inoculadas con la cepa silvestre o la cepa control de transformación.

Imágenes representativas de plantas de tomate procedentes de los distintos tratamientos con agua o con *T. parareesei* y sometidas a un estrés salino con NaCl 200 mM se recogen en la Figura 28. Se observaron diferentes grados de clorosis en plantas procedentes de los diferentes tratamientos. De forma general, se observó mayor grado de clorosis en plantas control (no inoculadas con *T. parareesei*) y, además, mucha diferencia en este parámetro entre plantas inoculadas con la cepa silvestre T6 y aquellas inoculadas con la cepa control de transformación.



**Figura 28.** Plantas de tomate de 6 semanas, inoculadas 4 semanas antes o no (control) con 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de *T. parareesei* T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu3 o S-cmu4, y regadas, las últimas 2 semanas, en días alternos con 5 mL por planta de NaCl 200 mM.

Para evaluar la tolerancia a la sal de plantas sometidas al estrés salino como una lámina de riego de 2 L de NaCl 300 mM en la bandeja contenedora, se realizó un recuento de hojas que presentaban clorosis y, a su vez, se estableció una escala con tres grados de clorosis diferentes (moderado, medio y máximo), además se cuantificaron las hojas verdaderas caídas. Los resultados de este ensayo se recogen en la Tabla 18. Considerando el número de hojas cloróticas y su distribución dentro de la escala de tres grados establecida, las plantas control y las plantas inoculadas con la cepa silvestre presentaron menor tolerancia a la sal.

**Tabla 18.** Respuestas de plantas de tomate, inoculadas con *T. parareesei*, a un estrés salino. Se inocularon 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de *T. parareesei* (T6, S-cmu0, S-cmu2, S-cmu3 o S-cmu4) a plantas de 2 semanas y 5 días después, se aplicó durante 2 semanas una lámina de 2 L de NaCl 300 mM en la bandeja contenedora de las maceta.

Condición	Número de hojas cloróticas			Hojas caídas (%)
	Moderado	Medio	Máximo	
Control	10	8	10	62,5
T6	9	11	6	25,0
S-cmu0	9	6	1	12,5
S-cmu2	10	7	0	0,0
S-cmu3	9	5	6	12,5
S-cmu4	9	9	1	0,0

Los recuentos, de hojas cloróticas y de hojas verdaderas caídas, se realizaron, para cada condición, sobre 8 plantas de tomate.

Las plantas inoculadas con la cepa S-cmu0 mostraron mayor tolerancia a sal que las inoculadas con T6 y no se observan diferencias destacables entre plantas inoculadas con la cepa control y las inoculadas con los tres transformantes silenciados incluidos en este ensayo en lo referido a hojas cloróticas. Sin embargo, las plantas control mostraron el mayor porcentaje de hojas verdaderas caídas, un 62,5%. Se observaron diferencias, en este parámetro, entre plantas tratadas con la cepa silvestre y plantas tratadas con S-cmu0, siendo en estas última menor el porcentaje de hojas caídas e igual al de plantas tratadas con el transformante S-cmu3. Además, no se cayeron hojas en plantas tratadas con las cepas silenciadas S-cmu2 o S-cmu4, indicativo este parámetro de una mayor tolerancia a sal.

### 8.3.2. Defensa frente a patógenos

Para evaluar la respuesta defensiva de plantas de tomate inoculadas o no (control) con *T. parareesei* se emplearon dos patógenos diferentes: *B. cinerea* y *Pst*.

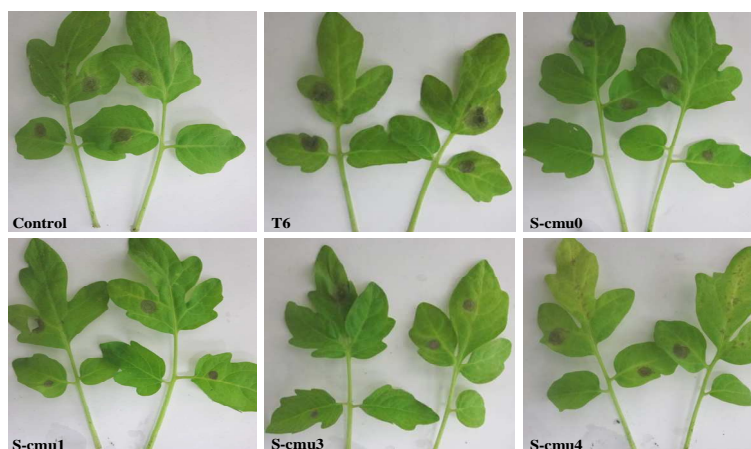
Se midió el tamaño de las lesiones producidas tras 72 horas de inocular artificialmente el patógeno foliar *B. cinerea* en hojas procedentes de plantas tratadas con *T. parareesei*, según se detalla en el apartado 14.2 de materiales y métodos. Para analizar el efecto del tiempo de la aplicación del hongo en la inducción de las defensas, se utilizaron plantas tratadas 48 horas o 15 días antes. Los tamaños de lesión presentados se obtuvieron a partir de 8 y 12 puntos de inoculación del patógeno, respectivamente.

El tamaño de las lesiones de *Botrytis* en las hojas de plantas de tomate (primer y segundo nivel), tratadas a la edad de 2 semanas con *T. parareesei* e inoculadas 48 horas después con el patógeno, se recoge en la Tabla 19. De forma general, las lesiones en hojas de primer nivel fueron mayores que las observadas en hojas de segundo nivel para las plantas de todas las condiciones consideradas. Además, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las lesiones de *B. cinerea* en hojas de primer (Figura 29) y de segundo nivel, procesadas separadamente, de plantas sometidas a los distintos tratamientos. Indicando esto último que, bajo las condiciones en las que se hicieron estos ensayos, no se observó inducción de defensas frente a *B. cinerea* en tomate por parte de ninguna de las cepas de *T. parareesei* consideradas.

**Tabla 19.** Diámetro, en cm, de lesiones provocadas por *B. cinerea* en hojas de tomate a las 72 horas de su inoculación. Las plantas se habían tratado, 48 horas antes de inocular el patógeno, con 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de *T. parareesei* (T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu3 o S-cmu4) o con 2 mL de agua (control).

Condición	Hojas segundo nivel	Hojas primer nivel
Control	0,50±0,09 <sup>a</sup>	0,68±0,30 <sup>ab</sup>
T6	0,66±0,2 <sup>a</sup>	0,90±0,12 <sup>a</sup>
S-cmu0	0,44±0,06 <sup>a</sup>	0,60±0,21 <sup>ab</sup>
S-cmu1	0,54±0,06 <sup>a</sup>	0,59±0,21 <sup>b</sup>
S-cmu3	0,56±0,06 <sup>a</sup>	0,56±0,28 <sup>b</sup>
S-cmu4	0,41±0,13 <sup>a</sup>	0,60±0,12 <sup>ab</sup>

Los valores son media de 8 lesiones con sus respectivas desviaciones estándar. Valores seguidos por diferentes letras en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



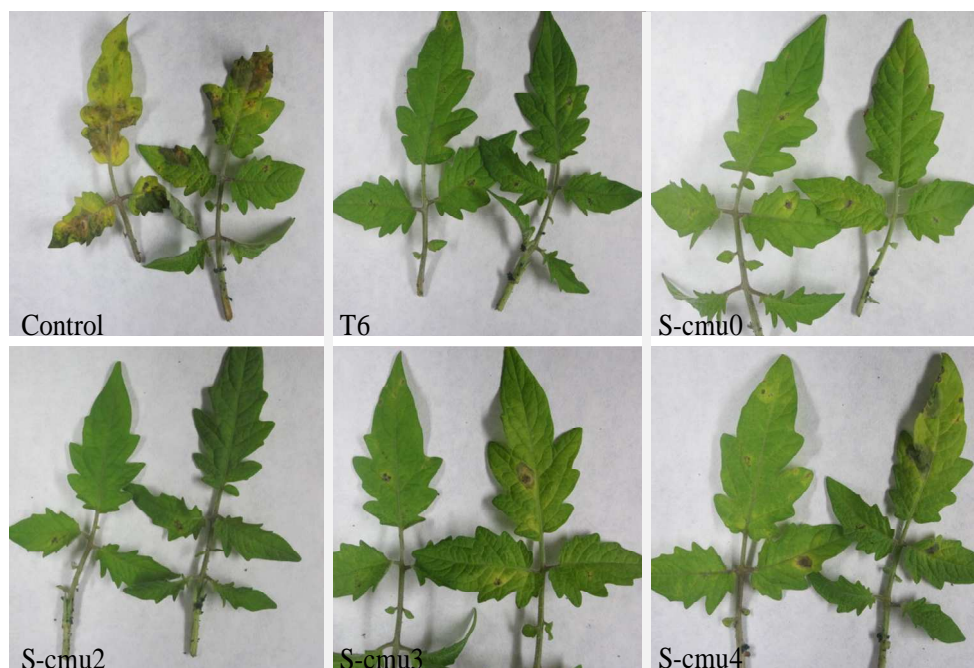
**Figura 29.** Lesiones de *B. cinerea* en hojas del primer nivel de plantas de tomate a las 72 horas de su inoculación. El patógeno se inoculó a las 48 horas de tratar las plantas con agua (control) o con la cepa de *T. parareesei* indicada en la parte inferior izquierda.

El tamaño de las lesiones a las 72 horas de inocular *Botrytis* en las hojas de plantas de tomate, tratadas a la edad de 2 semanas con *T. parareesei* e inoculadas 15 días después con el patógeno, se recoge en la Tabla 20, y se muestra un ejemplo de las mismas en la Figura 30.

**Tabla 20.** Diámetro, en cm, de lesiones provocadas por *B. cinerea* en hojas de tomate a las 72 horas de su inoculación. Las plantas se habían tratado, 15 días antes de inocular el patógeno, con 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de *T. parareesei* (T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu3 o S-cmu4) o con 2 mL de agua (control).

Condición	Hojas primer nivel
Control	0,33±0,09 <sup>a</sup>
T6	0,25±0,05 <sup>bc</sup>
S-cmu0	0,22±0,04 <sup>bc</sup>
S-cmu2	0,23±0,05 <sup>bc</sup>
S-cmu3	0,21±0,05 <sup>c</sup>
S-cmu4	0,28±0,09 <sup>b</sup>

Los valores son media de 12 lesiones con sus respectivas desviaciones estándar. Valores seguidos por diferentes letras en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test de Tukey (P<0,05).



**Figura 30.** Lesiones de *B. cinerea* en hojas del primer nivel de plantas de tomate a las 72 horas de su inoculación. El patógeno se inoculó a los 15 días de tratar las plantas con agua (control) o con la cepa de *T. parareesei* indicada en la parte inferior izquierda.



El tamaño de las lesiones de *Botrytis* en hojas de plantas tratadas, 15 días antes, con cualquiera de las cepas de *T. parareesei* ensayadas fueron significativamente menores que aquellas observadas en hojas de las plantas control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las lesiones de plantas sometidas a tratamientos con las diferentes cepas *T. parareesei*. Estos resultados indican que a tiempos relativamente largos (15 días) este hongo es capaz de inducir respuestas de defensa frente a *B. cinerea* en tomate y que el gen *Tpcm1* no parece afectar esas respuestas.

Por otro lado, se utilizaron dos cepas de un patógeno biotrofo, Pst, con diferente grado de virulencia para evaluar las respuestas defensivas de plantas de tomate tratadas previamente con *T. parareesei* o con agua, según se describe en el apartado 13.4 de materiales y métodos. En estos ensayos, *T. parareesei* se aplicó a plantas de 15 días, 48 horas más tarde se realizaron las infecciones de los patógeno y 72 horas después se tomaron las muestras de hoja para realizaron los recuentos de bacterias en las mismas.

Los resultados de los recuentos de bacterias en planta, para las dos cepas de Pst y de dos experimentos biológicos independientes, se recogen en la Tabla 21 y se expresan en UFC por disco de planta.

**Tabla 21.** Recuentos de bacterias obtenidos a las 72 horas de infectar plantas de tomate con Pst3000 o Pst3118. Las plantas se habían tratado, 48 horas antes de la infección con el patógeno, con 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de *T. parareesei* (T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 o S-cmu4) o con 2 mL de agua (control).

Condición	Experimento 1		Experimento 2	
	Pst3000	Pst3118	Pst3000	Pst3118
Control	$9,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$
T6	$6,5 \times 10^8$	$6,7 \times 10^6$	$>5,0 \times 10^8$	$9,7 \times 10^6$
S-cmu0	$3,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$>5,0 \times 10^8$	$9,6 \times 10^6$
S-cmu1	$3,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$7,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$
S-cmu2	Sin datos	Sin datos	$4,5 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$
S-cmu3	$6,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$7,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
S-cmu4	$5,6 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$>5,0 \times 10^8$

Los valores, expresados en UFC por disco de planta, se obtuvieron a partir de los recuentos realizados en 4 plantas por condición. Se realizaron dos experimentos biológicos independientes.

Los recuentos de la cepa Pst3000 muestran muchas diferencias para plantas control y plantas tratadas con S-cmu1 entre ambos experimentos. De manera general se observó mayor infección en plantas tratadas con T6 o en plantas tratadas con S-cmu0 que en plantas control. Y la infección fue similar en plantas tratadas con los transformantes S-cmu3 o S-cmu4 y plantas control, al menos, en el experimento 2.

Los recuentos de la cepa Pst3118 (cor<sup>-</sup>) en ambos experimentos, mostraron menor nivel de infección en las plantas tratadas con la cepa T6 que en las plantas control. Sin embargo, se observó mucha variabilidad en los recuentos de los dos experimentos independientes para plantas tratadas con S-cmu0, S-cmu1 o S-cmu4.

### 8.3.3. Cambios de expresión en genes marcadores de defensa en tomate

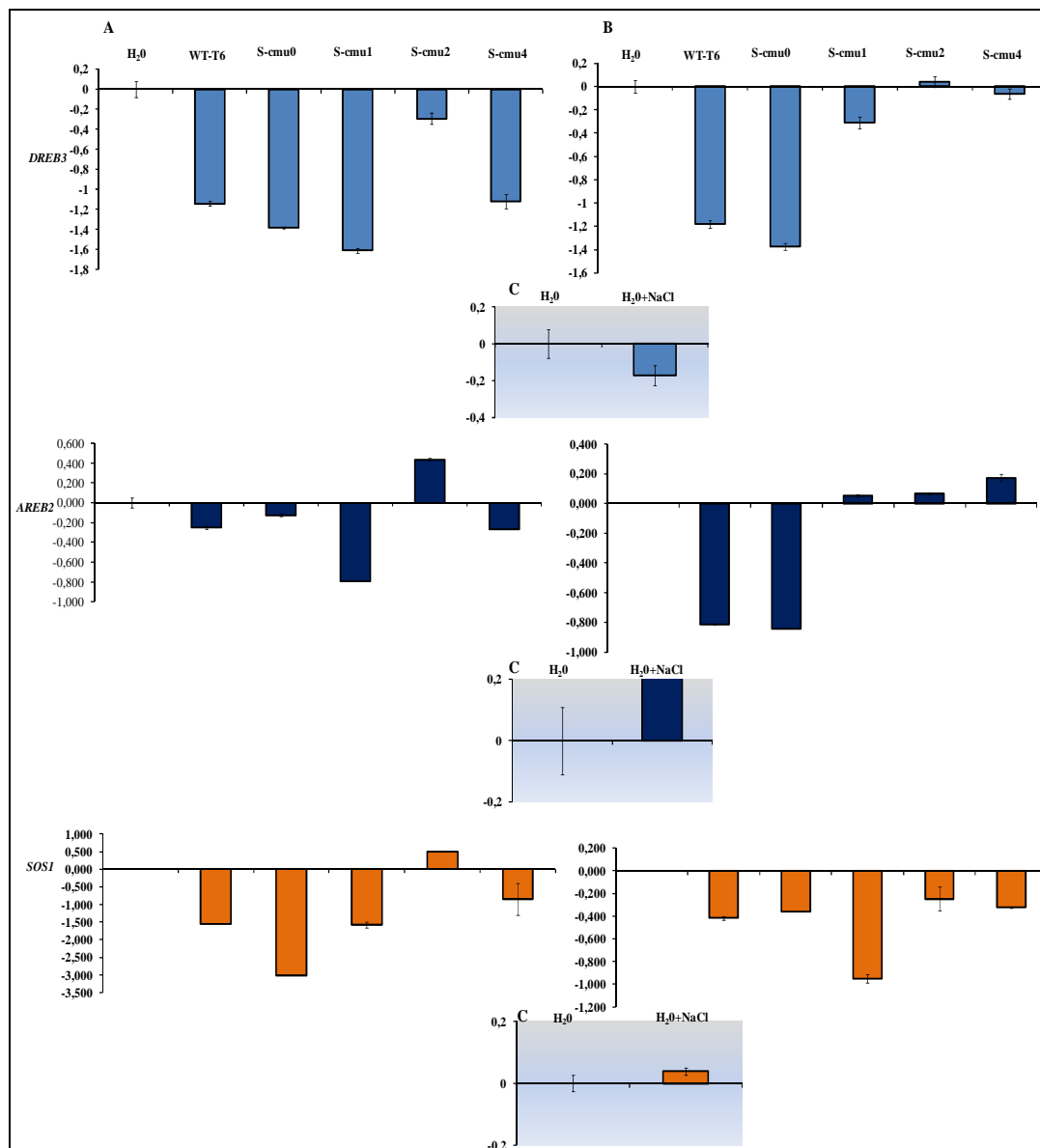
Para analizar cambios en las defensas de plantas de tomate relacionados con la aplicación de *T. parareesei* y con el silenciamiento del gen *Tpcm1* en el hongo, en ausencia o presencia de un estrés salino, se recogió material vegetal de plantas de 6 semanas, inoculadas o no con 2 mL de 10<sup>6</sup> esporas/mL de *T. parareesei* T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2 o S-cmu4 (a las dos semanas de edad), y sometidas, 15 días más tarde y durante dos semanas, a un estrés salino (riego con 5 mL de NaCl 200 mM por planta en días alternos) o no (riego con agua); y, por otro lado, también se recogió material de plantas de 4 semanas, inoculadas o no (control) como indica antes en su segunda semana de edad pero no sometidas a estrés salino. Ambos tipos de material vegetal se utilizaron para determinar, mediante *Real-time* PCR, los niveles de transcritos de tres genes marcadores de defensa frente a estrés abiótico (primer caso) y 3 genes marcadores de defensa frente a estrés biótico (segundo caso).

Como molde de las reacciones de amplificación se utilizaron 2 µL de ADNc, obtenido según el apartado 8.3.2 de materiales y métodos, a partir de ARN total que se extrajo, según se describe en el apartado 7.4 de materiales y métodos, de hojas de plantas sometidas a los diferentes tratamientos. Los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones y las condiciones en las que se llevaron a cabo estas reacciones se recogen en la Tabla 2 y el apartado 8.3.3 de materiales y métodos, respectivamente. Se analizaron tres genes relacionados con estreses abióticos: *DREB3* (*dehydration response element binding*), *AREB2* (*abscisic acid response element binding 2*) y *SOS1* (*Salt overly sensitive 1*), y 3 genes relacionados con estreses bióticos: *LOX1* (*lipoxygenase 1*), *EIN2* (*ethylene insensitive 2*) y *PR1* (*pathogenesis related protein 1*).

La expresión relativa de tres genes marcadores de defensa frente a estrés abiótico en plantas de tomate, inoculadas con las diferentes cepas de *T. parareesei* o no (control) y sometidas o no a un estrés salino, se muestra en la Figura 31. De forma general, no se observaron grandes diferencias en los niveles de expresión de estos tres genes en plantas inoculadas con la cepa silvestre T6 y plantas inoculadas con el control de transformación S-cmu0, ni en ausencia (Figura 31A) ni presencia de un estrés salino (Figura 31B).

En ausencia de estrés salino, la expresión de *DREB3*, marcador de deshidratación, fue significativamente más baja en plantas tratadas con cualquiera de las cepas de *T. parareesei* que en las plantas control y, a su vez, se observaron diferencias en los niveles de transcrito de este gen entre plantas tratadas con los transformantes

silenciados. Bajo el estrés salino, se observaron niveles de transcrito menores en plantas tratadas con las cepas T6 o S-cmu0 que en las tratadas con los transformantes silenciados. Los cambios observados en perfiles de expresión en ausencia y en presencia del estrés salino, indican que el silenciamiento de *Tpcmu1* en el hongo induce la expresión de *DREB3* en la planta en respuesta a sal.



**Figura 31.** Expresión relativa de los genes *DREB3*, *AREB2* y *SOS1* en plantas de tomate de 4 semanas, inoculadas a la edad de 2 semanas con 2 mL de  $10^6$  esporas/mL de *T. parareesei* (T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2 o S-cmu4) o con 2 mL de agua (control) y sometidas, 15 después y durante 2 semanas a un estrés salino (riego con 5 mL de 200 mM de NaCl por planta en días alternos). A), sin estrés salino, B) con estrés salino, C) expresión relativa en la condición control (sin *T. parareesei*) en presencia de sal con respecto a la condición en ausencia de sal. Como control de carga se utilizó el gen de la actina de tomate. Se tomaron como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de la condición control sin sal (A) y de la condición control con sal (B) ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ ), y los resultados se expresan como log10 de la expresión relativa.

En ausencia del estrés salino (Figura 31A), la expresión de *AREB2*, un gen señalizador de ABA, fue menor en plantas tratadas con T6 o S-cmu0 que en plantas control y, además, se detectaron niveles de transcrito muy variables en plantas tratadas con los transformantes S-cmu1, S-cmu2 o S-cmu4, siendo esos niveles respecto a los detectados en plantas de la condición control, respectivamente, mucho menores, mucho mayores o menores. Sin embargo (Figura 31B), la aplicación del estrés salino provocaba una fuerte represión de la expresión del gen en plantas tratadas con T6 o S-cmu0 pero la inducía en plantas tratadas con cualquiera de los tres transformantes silenciados utilizados, sobre todo con S-cmu4.

El perfil de expresión de *SOS1*, un marcador de resistencia a estrés salino, fue similar en ausencia y en presencia del estrés salino excepto en plantas tratadas con el transformante S-cmu2 (Figura 31). En cualquier caso, salvo la inducción observada en plantas tratadas con S-cmu2 en ausencia del estrés salino, se observó una represión en plantas tratadas con cualquiera de las cepas de *T. parareesei*, tanto en ausencia como en presencia de sal, respecto a la expresión detectada en las plantas control.

La expresión relativa de genes marcadores de defensa frente a estrés biótico en plantas de tomate, inoculadas con las diferentes cepas de *T. parareesei* o no (control), en su segunda semana de edad, se muestra en la Figura 32. De forma general, no se observaron grandes diferencias en los niveles de expresión de estos tres genes entre plantas inoculadas con la cepa silvestre T6 y plantas inoculadas con el control de transformación S-cmu0. Además, se observaron similares perfiles de expresión para los genes *LOX1* y *EIN2*, en todas las plantas tratadas con *T. parareesei*, siendo sus niveles inferiores a los observados en las plantas control, mientras que los niveles de expresión del gen *PRI* en esas mismas eran superiores a los observados en las plantas control.

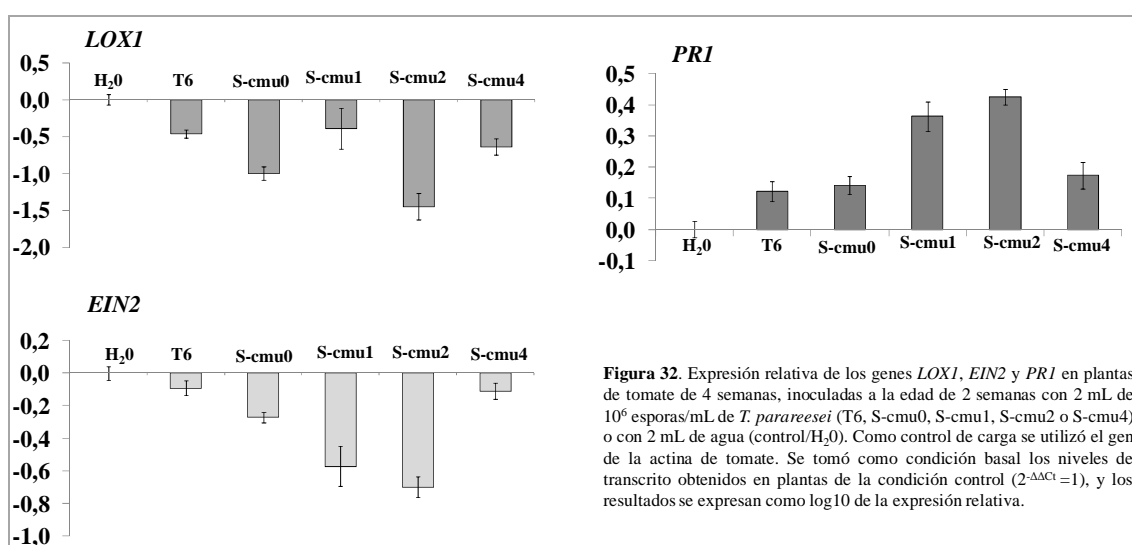


Figura 32. Expresión relativa de los genes *LOX1*, *EIN2* y *PRI* en plantas de tomate de 4 semanas, inoculadas a la edad de 2 semanas con 2 mL de  $10^8$  esporas/mL de *T. parareesei* (T6, S-cmu0, S-cmu1, S-cmu2 o S-cmu4) o con 2 mL de agua (control/H<sub>2</sub>O). Como control de carga se utilizó el gen de la actina de tomate. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de la condición control ( $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ ), y los resultados se expresan como log<sub>10</sub> de la expresión relativa.

## **DISCUSIÓN**

---



Desde hace varias décadas, cepas del género *Trichoderma* se vienen utilizando con éxito en el control biológico de microorganismos fitopatógenos en ambiente natural (Monte, 2001). Son numerosos los trabajos científicos que recogen la habilidad de muchas de sus especies para degradar la pared celular de los patógenos sin atacar a la planta (Harman y col., 2000; Jiménez-Díaz y col., 2010a). En este sentido, se han relacionado tanto genes que codifican enzimas líticas (glucanasas, quitinasas, proteasas, etc.) como genes que codifican metabolitos secundarios (terpenos, policétidos, peptaiboles, etc.), con las habilidades antagonistas de hongos de este género (Limón y col., 1999; Malmierca y col., 2012, 2014a).

La variedad de aplicaciones biotecnológicas de *Trichoderma* ha contribuido a incrementar el interés por este género y, por ende, por la secuenciación del genoma de cepas representativas de algunas de sus especies (<http://genome.jgi-psf.org>) (Martínez y col., 2008; Kubicek y col., 2011), aumentando exponencialmente en estos últimos años la información a la que podemos acceder. Además, y como consecuencia de los resultados obtenidos en estudios genéticos y genómicos (Rubio y col., 2009; Mukherjee y col., 2011; Tijerino y col., 2011b), está creciendo el interés por conocer las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios en *Trichoderma*, no solo por su implicación en el metabolismo del hongo sino por el papel que puedan jugar esos metabolitos en sus interacciones ecológicas (Mukherjee y Kenerley, 2010; Velázquez-Robledo y col., 2011; Malmierca y col., 2012; Mukherjee y col., 2012; Hermosa y col., 2014; Malmierca y col., 2014a).

Esta tesis doctoral se enmarca dentro del proyecto MINECO “Tirosol y farnesol como moléculas autorreguladoras en *Trichoderma* y señalizadoras en la interacción *Trichoderma*-tomate”, cuyo objetivo general es estudiar el papel de ambos metabolitos en el hongo y en las relaciones que establece con la planta.

El tirosol es un compuesto fenólico producido por la ruta del shikimato en organismos tan dispares como procariotas, algas, hongos o plantas (Weiss y Edwalds, 1980; Eberhard y col., 1996; Tzin y Galili, 2010). Mientras que en bacterias y en plantas se dispone de mucha información de la ruta biosintética del shikimato, de su regulación y del papel biológico de muchos de los metabolitos formados en esta ruta (Whitaker y col., 1985; Vogt, 2010), los estudios en hongos se ha realizado casi únicamente con levaduras, asignándoles a los alcoholes aromáticos formados en esta ruta, particularmente al tirosol, un papel de moléculas señalizadoras que aceleran los cambios morfológicos desde un estado levaduriforme a uno hifal (Chen y col., 2004; Alem y col., 2006; Chen y Fink, 2006; Gori y col., 2011). En este sentido, cuando en ensayos realizados al comienzo de esta tesis se siguió, cualitativa y cuantitativamente, el crecimiento de la cepa *T. parareesei* T6 en cultivos líquidos con diferentes concentraciones de tirosol e inoculados con distintas cantidades de esporas, no se observaron diferencias ni en el tiempo al que comenzaban a germinar las esporas ni en la longitud del tubo germinativo alcanzado a diferentes tiempos de iniciado el ensayo.

Este resultado estaría de acuerdo con el obtenido previamente en un estudio realizado con *P. brasiliensis*, donde ensayando concentraciones de hasta 300  $\mu\text{M}$  de tirosol, no se pudo asignar un papel señalizador a la molécula en este hongo dimórfico (Derengowski y col., 2009).

Por otro lado, es importante apuntar que en un estudio previo, realizado en nuestro grupo utilizando *macroarrays* de *Trichoderma*, se detectó que el gen que codifica una hipotética corismato mutasa aumentaba su expresión en *T. harzianum* a las 8 h de interacción con raíces de olivo, pero también se ha observado, a partir de estudios realizados con *microarrays*, que este gen disminuía su expresión en *T. atroviride* durante su micoparasitismo sobre el fitopatógeno *R. solani* (Kubicek y col., 2011). A su vez, en un estudio transcriptómico de *T. parareesei* en interacción con raíces de tomate, realizado previamente en nuestro grupo y publicado recientemente (Rubio y col., 2014), se había observado en el hongo un aumento significativo de la expresión de los genes que codifican la shikimato deshidrogenasa y la shikimato kinasa, enzimas que intervienen secuencialmente en la biosíntesis de corismato, en las primeras horas de interacción con la planta. Estos resultados justificarían el interés por analizar la ruta de shikimato en *Trichoderma* y cómo la producción por parte del hongo de metabolitos secundarios de esta ruta afecta a sus habilidades micoparasíticas y a sus interacciones con la planta.

Los resultados obtenidos en los ensayos preliminares realizados adicionando tirosol comercial al medio de crecimiento de plantas de tomate indicaban que este compuesto, en función de su concentración en el medio, puede actuar como inductor o como inhibidor de la germinación de semillas, esto último ocurriría a partir de concentraciones de 1 mM. Por tanto, el tirosol podría jugar un papel importante en la relación que establece *Trichoderma* con las plantas. En este sentido, algunos artículos han descrito la producción de tirosol en diferentes especies de este género (Tarus y col., 2003; Daoubi y col., 2009; Tijerino y col., 2011b), pero sin contemplar su papel en los mecanismos de acción como agente de biocontrol.

Como se ha indicado anteriormente el tirosol se produce por la ruta del shikimato, y se identificaron varios genes de esta ruta en el genoma de *H. jecorina*/*T. reesei* QM6a (Martinez y col., 2008), uno de los tres genomas secuenciados y disponibles *on line* cuando se comenzó esta tesis doctoral. Ya que *T. parareesei* se ha descrito como una nueva especie que agrupa aislamientos del suelo que anteriormente estaban identificados como *T. reesei* (Atanasova y col., 2010; Dhuzinina y col., 2010) y, por tanto, que ambas especies están filogenéticamente muy próximas, se utilizó ese genoma para diseñar oligonucleótidos y clonar un gen de la ruta del shikimato, el *Tpcm1*, en *T. parareesei* cepa T6. Se amplificó un gen de 974 pb que, tras su secuenciación, mostró ser idéntico en las cepas QM6a y T6. La diferencia de tamaño entre el producto amplificado a partir de ADN genómico de T6 y el obtenido a partir de ADNc se debía a la presencia de dos intrones, en los que se localizaron, como se



muestra en la Tabla 4, las secuencias consenso típicas de los extremos 5' y 3', y de la región intermedia donde se forma el lazo previo a su escisión, descritas previamente en intrones de hongos filamentosos (Ballance, 1986). Aunque también posee dos intrones el gene que codifican la corismato mutasa de *A. nidulans* (Krappmann, 1999) o el de nematodos (Huang y col., 2005; Vanholme y col., 2009), los tres genes de *Arabidopsis*, poseen 5 intrones.

La traducción del ORF del gen, 801 pb, dio una secuencia de 266 aminoácidos de correspondía a una proteína de un peso molecular teórico de 23,94 kDa y un punto isoelectrico (pI) de 5,44, valores algo alejados de los 30 kDa y pI 4,7 determinados para la proteína purificada de *A. nidulans* (Krappmann y col., 1999), o de los 30 kDa que pesa cada una de la dos subunidades que forman la proteína en levaduras (Schmidheini y col., 1990). Esta discrepancia estaría de acuerdo con bibliografía existente que recoge como los pesos moleculares experimentales son superiores a los teóricos debido a las modificaciones post-traduccionales de la proteína (Contreras-Esquivel y Voget, 2004), y con los abundantes sitios de fosforilación y glicosilación detectados tras la predicción *in silico* de la estructura secundaria de la proteína TPCMUI (Figura 13).

Por otro lado, en los análisis *in silicio* de TPCMUI se detectó una estructura casi completamente de tipo hélice  $\alpha$ , como ocurre con la proteína de levaduras y *A. nidulans*, pero que no se puede generalizar para la corismato mutasa de todos los organismos (Schnappauf y col., 1997); y, con una probabilidad superior al 65%, una ubicación citoplasmática. La ausencia de péptido señal está también de acuerdo con el carácter hidrofílico detectado en el perfil hidropático. Además, en la secuencia se detectó un dominio corismato mutasa monofuncional que se extendía casi a lo largo de toda la proteína, aminoácidos 14 a 262.

Se llevó a cabo un alineamiento de TPCMUI con secuencias depositadas en bases de datos con las que esta proteína mostró mayor nivel de similitud, siendo todas ellas hipotéticas corismato mutasa de hongos filamentosos resultantes de proyectos de secuenciación de genomas. Al igual que ocurrió para la secuencia nucleotídica, la proteína presentó una homología del 100% con la proteína de *H. jecorina/T. reesei*, y de casi un 90% con la proteína de *T. virens* y de *T. atroviride*, e identidades de 70 a 80% con la hipotética corismato mutasa de muchos hongos filamentosos patógenos. Se observaron en posiciones conservadas de TPCMUI, los aminoácidos que en el enzima de levaduras son importantes para la unión de efectores y para la traducción de señal alostérica, así como, para su sitio activo (Sträter y col., 1996).

Con objeto de obtener la región promotora del gen *Tpcmui* de *T. parareesei*, se diseñó una pareja de oligonucleótidos, uno sobre *Tpcmui* y otro sobre la región promotora del gen *cmui* de *T. reesei*, disponible esta última en el genoma *on line*. Aunque se amplificó un fragmento de PCR de 700 pb utilizando como molde ADN de la cepa *T. parareesei* con esa pareja de oligonucleótidos, no se obtuvieron, aunque se

secuenció varias veces, unos cromatogramas limpios en los que se pudiera leer más de 170 pb. Sin embargo, se podía encontrar en esa secuencia una caja TATA, indicativa de que era región promotora, y a pesar de la baja homología que mostraba con la secuencia promotora del gen de *T. reesei*, se observó conservación en motivos relacionados con la unión de factores de transcripción entre ambas secuencias. Por tanto, se realizó un análisis *in silico* de 500 pb de la región promotora del gen *cmu1* de *T. reesei* para obtener información sobre la regulación de este tipo de genes.

En cuando a la expresión del gen *Tpcm1* en *T. parareesei* T6, los resultados obtenidos mediante *Real-time* PCR tras incubar al hongo bajo distintas condiciones de cultivo, así como, aquellos del análisis *in silico* de 500 pb de la región promotora del gen *cmu1* de *T. reesei*, indican regulación de este gen a nivel transcripcional. En este sentido, se conoce que la ruta del shikimato en procariotas y eucariotas inferiores está sometida a control transcripcional y post-transcripcional (Hermann, 1995). La mayoría de trabajos se ha realizado midiendo la actividad del enzima cabecero de la ruta, la DAHP (Eversloh y Stephanopoulos, 2005), o de la corismato mutasa. Para esa última, se han descrito una regulación de su actividad por retroalimentación, inhibición causada Tyr o por Phe, y una alostérica debida al Trp que se forma vía antranilato y que actúa como activador. En este sentido, se ha publicado que la actividad corismato mutasa se inhibe por Tyr o por Phe en bacterias como *Nocardia* sp., levaduras como *C. albicans* y *S. cerevisiae*, y plantas como *Arabidopsis* (Boer y col., 1989; Boder y Birnbaum, 1991; Tzin y Galili, 2010), o por Tyr en el hongo filamentosos como *A. nidulans*, así como, que el Trp aunque reprime esa actividad en bacterias, la induce en levaduras, en *A. nidulans* o en *Arabidopsis*. Ya que nosotros observamos un incremento de expresión de *Tpcm1* cuando el hongo se cultivó en presencia de cantidades micromolares de Tyr, de Phe o de Trp y que aumentaba al subir la concentración de los aminoácidos aromáticos en el medio de cultivo, pudiera pensarse que la regulación sobre la actividad del enzima estaría por encima de la regulación transcripcional. En este sentido, nosotros también observamos en ensayos preliminares no incluidos en la sección de resultados, una bajada de actividad cuando incluíamos Tyr en los ensayos de actividad corismato mutasa realizados con proteínas intracelulares obtenidas de *T. parareesei* T6. Este enayo se realizó con el objeto de poner a punto el ensayo de actividad corismato mutasa. Por otro lado, se ha descrito para *aroC*, gen que codifica la corismato mutasa en *A. nidulans*, que bajo condiciones de déficit de aminoácidos no existiría regulación a nivel transcripcional (Krappmann y col., 1999). Por tanto, a pesar de que en la región promotora de *cmu1* se localizó una caja StuAp, factor de transcripción que regula *cluster* biosintéticos de metabolitos secundarios en hongos filamentosos como *Fusarium* (Lysøe y col., 2011), y de que se observó represión por glucosa e inducción por déficit de nitrógeno en un medio de cultivo no suplementado con aminoácidos aromáticos para *Tpcm1*, el control génico que existe a este nivel podría estar supeditado a la regulación post-traducciona.

Detectamos represión en presencia de glucosa, hecho que se correlaciona con la existencia en el promotor de *cmu1* de dos cajas 5'-SYGGRG-3'. Este dato está de acuerdo con la represión, en presencia de glucosa, descrita para muchos genes que codifican hidrolasas (Rubio y col., 2008; Morán-Diez y col., 2009). Parece que la unión del regulador Cre1/CreA a estas cajas se ve favorecida por una proximidad entre ellas (Mach y col., 1996), pero en este promotor se encontraban a más de 200 pb. También se encontraron varias secuencias 5'-HGATAR-3', involucradas en la unión del regulador AreA/Nit2 relacionado con el metabolismo del nitrógeno, resultado que correlaciona con el incremento de expresión de *Tpcm1* en medios de cultivos con déficit de nitrógeno. En *Trichoderma* se ha descrito la inducción por déficit de nitrógeno en genes que codifican desde quitinasas o glucanasas hasta genes que codifican transportadores de membrana (Limón y col., 1999; Montero y col., 2005; Vizcaíno y col., 2006b).

A pesar de que en el promotor de *cmu1* no se encontraron secuencias con los cuatro motivos MYC conocidos (Cortés y col., 1998), relacionados con procesos de micoparasitismo, se observaron altos niveles de expresión del gen *Tpcm1* en presencia de paredes celulares de *R. solani* al 1%. En este sentido, un aumento de expresión en presencia de quitina, paredes de patógenos o de déficit de fuentes de carbono o de nitrógeno es un patrón bastante común en genes que codifican enzimas que degradan quitinasas o glucanasas, relacionadas directamente con las habilidades antagonistas de *Trichoderma* (Lorito y col., 1998). Sin embargo, este resultado no está de acuerdo con la baja de expresión del gen cuando *T. atroviride* micoparasita *R. solani*, observada a partir de datos de *microarrays* (Kubicek y col., 2011).

También se observaron altos niveles de expresión en presencia de material vegetal al 1%, ya en cultivos de tiempo muy corto como son las 4 horas, patrón que relaciona este gen con interacciones hongo-planta. Ya que la expresión del gen con material vegetal baja desde las 4 a las 24 horas de cultivo, los elevados niveles de transcrito observados bajo estas condiciones de cultivo no deberían asociarse a una situación de estrés para el hongo, más bien debería pensarse que algunos componentes de las plantas o compuestos que se generen por acción de los enzimas del hongo sobre el material vegetal estarían induciendo su expresión. Esta inducción del gen por material vegetal está de acuerdo con el incremento de expresión observado para este gen u otros genes de la ruta del shikimato en interacciones de *T. harzianum* con plantas de olivo o con plantas de tomate (Rubio y col., 2014).

La presencia en la región promotora de *cmu1* de cajas para la unión de varios factores de transcripción de respuestas a estrés abióticos (ejemplo: HSFs, STRE, etc), estaría de acuerdo con que la producción de muchos metabolitos secundarios en los hongos filamentosos se ha asociado a condiciones de estrés (Yu y Keller, 2005). Aunque parece claro que la regulación de la corismato mutasa en *T. parareesei* T6, y posiblemente en otros hongos filamentosos, es muy compleja y está sometida a varios mecanismos de regulación ya que la inducción observada en presencia de paredes de un

patógeno para un hongo micoparásito como *Trichoderma* no puede considerarse como una situación de estrés. En este sentido, se identificaron *in silico* varios sitios de fosforilación en la estructura secundaria de TPCMUI relativos a procesamientos post-traduccionales de la proteína y, como se ha publicado para otros hongos (Yu y Keller, 2005; Bayram y col., 2008), la producción de metabolitos secundarios en *Trichoderma* se ve afectada por proteínas G y kinasas (Reithner y col., 2007).

Como productos finales de la ruta del shikimato, ausente en animales, se han identificado alcoholes aromáticos, entre ellos el tirosol, pero antes que ellos, se forman los aminoácidos aromáticos, por tanto, esta ruta biosintética es imprescindible en el metabolismo primario de organismos como bacterias, hongos y plantas para la síntesis de algunas de sus proteínas (Eberhard y col., 1996; Craig y col., 2002). En este sentido, para el análisis funcional de genes de esta ruta no pueden utilizarse aproximaciones de interrupción génica.

La ruta del shikimato en bacterias se destina casi exclusivamente a la producción de proteínas, pero en organismos como plantas, los aminoácidos formados son precursores de una gran variedad de metabolitos secundario, que tienen múltiples funciones biológicas (Vogt, 2010). Este es el caso del SA que en plantas se forman en la ruta del shikimato, bien a partir de isocorismato, por acción de la isocorismato sintasa (ICS), bien a partir de Phe por acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL) (Chong, 2001; Tamaoki, 2008; Dempsey y col., 2011; Hara, 2012). Sin embargo, esta ruta no está muy estudiada en hongos filamentosos. De hecho, está descrito que *Trichoderma* produce a partir de Trp, por varias rutas que no están completamente caracterizadas, diferentes compuestos de naturaleza indólica como el IAA (Contreras-Cornejo y col., 2009). En este sentido, el IAA producido por *Trichoderma* se ha relacionado con el desarrollo de raíces secundarias en las plantas y sus efectos positivos en la promoción del crecimiento de las mismas (Contreras-Cornejo y col., 2009; Hermosa y col., 2012).

El silenciamiento génico por siRNA se ha convertido en una alternativa real para el análisis funcional de genes esenciales, por ejemplo los de la ruta del shikimato, como se ha indicado antes, o genes de aquellos organismos en los que resulta difícil la obtención de mutantes nulos mediante interrupción génica, como es el caso de *Trichoderma*, ya que la frecuencia de recombinación homóloga es muy baja (Mach y Zeilinger, 1998).

Los análisis funcionales de genes de la ruta del shikimato son muy escasos en hongos filamentosos. Un silenciamiento génico de *Vlaro2*, gen que codifica la corismato sintasa en *Verticillium longisporum*, redujo su capacidad para infectar plantas de *Arabidopsis* y también de su hospedador, *Brassica napus* (Singh y col., 2010). Sin embargo, no hemos encontrado referencias de análisis funcionales del gen que codifica la corismato mutasa en hongos filamentosos.

Con objeto de asignar función al gen *Tpcm1* de *T. parareesei* T6 se obtuvieron transformantes en los que este gen estaba silenciado. Se ha demostrado el potencial de ciertas construcciones que codifican horquillas de ARN complementarias (*self-complementary hairpin RNA* o *hpRNA*) en el silenciamiento eficaz de genes de plantas (Wesley y col., 2001) y de hongos patógenos como *Aspergillus* y *Fusarium* (McDonald y col., 2006). En este sentido la cepa *T. parareesei* T6 se transformó con el plásmido pJL43b1-Cmu1. Una estrategia similar ha permitido asignar función a varios genes de la ruta de los terpenos en *T. harzianum* (Cardoza y col., 2006b; 2007) o, particularmente de trichotecenos, en *T. arundinaceum* (Malmierca y col., 2012), relacionándolos con sus habilidades antifúngicas frente al fitopatógeno *B. cinerea*, y un silenciamiento de *Thpg1* ha relacionado la ThPG1 de *T. harzianum* con la capacidad colonizadora de raíz y la inducción de defensas en planta (Morán-Diez y col., 2009).

Aunque no se ha incluido en las secciones de materiales y métodos y de resultados, para la obtención de transformantes se utilizaron dos tipos de metodologías diferentes, protoplastos y *Agrobacterium*. En este último caso, se transformó la bacteria con el plásmido pUR5750 y se utilizó, posteriormente, para infectar la cepa T6, pero no se obtuvieron transformantes. En este sentido, se ha publicado que la eficacia de transformación por ambas metodologías varía según la especie de *Trichoderma* (Cardoza y col., 2006a), aunque al día de hoy todavía no se ha publicado la transformación en *T. parareesei*. Los resultados positivos se obtuvieron con la transformación mediada por protoplastos. Para preparar la construcción de silenciamiento se utilizó un fragmento de 500 pb del gen *Tpcm1* bajo el control del promotor constitutivo del gen *ta* de *T. harzianum* (Sousa, 2004), que había mostrado ya su eficacia en el silenciamiento génico en *Trichoderma* (Cardoza y col., 2007; Morán-Diez y col., 2009). La integración del *cassette* de transformación pJL43b1-Cmu1 fue confirmada mediante PCR en 7 de los 8 transformantes con resistencia a fleomicina obtenidos. Cuando el número de inserciones del *cassette* de transformación se determinó mediante análisis tipo *Southern*, todos los transformantes, excepto el S-cmu3, mostraron la banda de 4,5 kb correspondiente al *cassette* de fleomicina utilizado como sonda. Además, la banda o bandas de tamaño inferior a 4,5 kb observadas también en los transformantes S-cmu1, S-cmu2 y S-cmu3, indicaba la integración o integraciones de una parte del *cassette* de transformación en esas cepas. En este punto, se seleccionaron transformantes representativos de los diferentes modelos de integración de *cassette* observados en el *Southern* (S-cmu1, S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4) y también un transformante control (S-cmu0), obtenido por transformación de la cepa T6 con el plásmido vacío, para ser incluidos en estudios posteriores.

Con objeto de determinar si la horquilla del fragmento del *Tpcm1* presente en el vector pJL43b1-Cmu1 utilizado para transformar la cepa silvestre era efectiva, analizamos los niveles de transcrito mediante *Real-time* PCR en los transformantes S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4, crecidos bajo diferentes condiciones. Considerando los diferentes niveles de expresión del gen detectados en la cepa silvestre bajo diversas

condiciones de cultivo, se seleccionaron 3 medios de cultivo diferentes, que incluían o no aminoácidos relacionados con la regulación de la ruta, para comparar los niveles de transcrito de transformantes silenciados putativos con los del transformante control. Como cabía esperar, los tres transformantes mostraron menores niveles de transcrito que la cepa control a las 24 horas de crecimiento en un medio pobre con glucosa al 2% (Penttilä y col., 1987). Sin embargo, cuando al medio de cultivo se añadían Tyr o Trp, los niveles de transcrito subieron en todos los transformantes y fueron, excepto para el transformante S-cmu4, iguales o superiores a los detectados en la cepa control. Estos resultados indicarían que esta ruta está sometida a diferentes tipos de regulación y, a su vez, en distintos niveles. En bacterias y plantas se ha descrito que los aminoácidos aromáticos también pueden inhibir la actividad enzimática cabecera de la ruta y que este sería el principal mecanismo regulador del camino (Tzin y Galili, 2010). Así, los transformantes S-cmu1 y S-cmu3, para mantener el equilibrio en la producción de los tres aminoácidos, formarían más transcrito para compensar ese silenciamiento cuando se adiciona alguno de ellos al medio, mientras que el transformante S-cmu4, parece tener tal grado de silenciamiento, que no es superado con la adición de aminoácidos que también participan en la regulación esta ruta.

Con objeto de verificar el funcionamiento de la maquinaria de silenciamiento, se determinó la actividad corismato mutasa en la cepa silvestre T6, S-cmu0 S-cmu1, S-cmu3 y S-cmu4, empleando proteínas intracelulares obtenidas de micelios procedentes de cultivos de 48 horas en diferentes medios, suplementados o no con cada uno de los tres aminoácidos aromáticos. Se observó, bajo las cuatro condiciones de cultivo ensayadas, una disminución estadísticamente significativa de la actividad corismato mutasa en 3 de los 4 transformantes analizados considerandolos los valores detectados en la cepa control. Para la cepa silvestre, la adición de Phe o de Tyr al medio de cultivo, disminuía la actividad. Estos resultados estarían de acuerdo con la regulación negativa que ocasionan ambos aminoácidos en la actividad de la corismato mutasa (Tzin y Galili, 2010). Ya que una adición de Trp 2 mM al medio no activó este enzima en la cepa T6, respecto a la actividad detectada en un medio mínimo (GnNn), quizás la concentración de Trp utilizada sea demasiado elevada y está reprimiendo el enzima cabecero de la ruta, pues se ha descrito que el Trp también puede inhibir la DAHP (Tzin y Galili, 2010).

Llama la atención que cuando se añadió algunos de los tres aminoácidos al medio de cultivo, los valores de actividad obtenidos para la cepa silvestre y la cepa control discreparon bastante, cosa que no ocurría en el medio GnNn, un medio mínimo con glucosa al 2%. Ello indicaría que bajo algunas condiciones de cultivo, pero no todas, la inserción de un plásmido en el genoma de *Trichoderma* afecta a la ruta del shikimato. Además, la cepa S-cmu1, que presentó a las 24 horas de cultivo en medio GnNn menores niveles de transcrito que S-cmu0, mostró mayores niveles de actividad que ninguna de las otras cepas en ese medio. Esta cepa presentó, como se discutirá más adelante, un fenotipo muy diferente al de las cepas T6 y S-cmu0 solamente en las

primeras 24 horas de cultivo, porque después de este tiempo su crecimiento y esporulación se asemejaban a los de ellas y, como se ha dicho, la actividad corismato mutasa se midió en cultivos de 48 horas. Por otro lado, la falta de correlación entre el patrón de inserciones del *cassette* de transformación en las cepas y los niveles del transcrito de *Tpcm1* o los valores de actividad, en este caso corismato mutasa, ha sido descrita previamente en *Trichoderma*, tanto en sobreexpresantes (Limón y col., 1999; Montero-Barrientos y col., 2007, 2008) como en transformantes silenciados (Morán-Diez y col., 2009).

Ya que la ruta del shikimato afecta también al metabolismo primario de los microorganismos, analizamos cómo el silenciamiento un gen de esta ruta afectaba al fenotipo del hongo, así, se determinó el crecimiento de las cepas bajo diferentes condiciones, contemplando las variantes de temperatura y de medio de cultivo. Se observaron o no diferencias en los diámetros de crecimiento entre cepas según el medio de cultivo utilizado y el tiempo de cultivo. Aunque en un medio rico como es el PDA, las diferencias de crecimiento entre cepas disminuían a medida que avanza el cultivo, los transformantes S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 crecieron menos que T6 o que S-cmu0 en los otros 4 medios sólidos ensayados, observando las mayores diferencias en el medio mínimo GnNn. Ese menor crecimiento, en las primeras horas de cultivo, eran mucho más evidente para el transformante S-cmu1, pero alcanzaba a las 48 horas los mismos tamaños de colonia que las cepas T6 y S-cmu0, las que por otro lado mostraron tamaños de colonia casi idénticos en los 5 medios ensayados. A su vez, los cuatro transformantes analizados esporulaban más rápidamente que las cepas silvestre y control en todos los medios, incluido el PDA. La esporulación de los hongos se asocia con mecanismos de supervivencia, bajo condiciones de estrés, y dispersión. En este sentido, está descrito que la conidiación en *Trichoderma* envuelve mecanismos moleculares muy sofisticados, que son clave en su regulación los foto-receptores VELVET, ENVOY y BLR-1/BLR2, y la NADPH oxidasa, y que se ve inducida por luz, heridas mecánicas, nutrientes (déficit de nitrógeno), pH y condiciones medioambientales (Carreras-Villaseñor y col., 2012). Y, aunque la capacidad de las cepas para pigmentar el medio variaba según éste, se observó mayor pigmentación de los diferentes medios utilizados para cultivarlas, sólidos y líquidos, con las cepas S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 que con T6, S-cmu0 y S-cmu1, una característica que se relaciona con la producción de metabolitos secundarios (Keller y col., 2005).

Por otro lado, la diferencia en el tamaño de las colonias se observó (Tabla 9) independientemente de la temperatura a la que se incubaron las cepas. Se ha descrito que la temperatura óptima de crecimiento de la especie *T. parareesei* está próxima a los 37°C (Atanasova y col., 2010; Druzhinina y col., 2010); y nosotros hemos publicados recientemente (Rubio y col., 2014), que los exudados de raíces de tomate favorecen el crecimiento de la cepa silvestre *T. parareesei* T6. Dado que las diferencias de crecimiento entre los transformantes y las cepas T6 y S-cmu0 se mantienen más o menos constantes a las tres temperaturas ensayas, parece que este parámetro no afecta

en gran medida a la ruta shikimato. Cuando se comparó el crecimiento utilizando el medio líquido MS, que se utiliza para el crecimiento *in vitro* de las plantas, adicionado o no con exudados de plantas, solo los transformantes S-cmu2 y S-cmu4, independientemente de la temperatura de cultivo, mostraron menor crecimiento que T6 y S-cmu0.

Con objeto de determinar si los menores diámetros de crecimiento observados en los transformantes respecto a las cepas silvestre y control, sobre todo, en un medio mínimo (GnNn) revertían al añadir los diferentes aminoácidos aromáticos que se producen en la ruta del shikimato, se realizó un ensayo de complementación. Aunque el Trp afectó negativamente al crecimiento de todas las cepas, la adición conjunta de los tres aminoácidos aromáticos revertía el fenotipo de las cepas S-cmu1 y S-cmu3, que igualaron su crecimiento con T6 y S-cmu0. Sin embargo, los transformantes S-cmu2 y S-cmu4 mostraron, independientemente de los aminoácidos añadidos o de su combinación, menores diámetros de crecimiento que las cepas T6 y control. Aunque cuando se añadieron los tres aminoácidos, el aspecto de las colonias de todas las cepas era semejante (Figura 23). Dada la amplia variedad de compuestos formados en la ruta de shikimato que participan en su regulación y que a su vez, como se ha descrito en planta para la Phe o el Trp, pueden ser precursores de metabolitos secundarios muy variados (Chong, 2001; Hara, 2012), esta ruta sería bastante difícil de complementar.

Considerando los resultados de crecimiento obtenidos en los diferentes medios de cultivo, sólidos y líquidos, y a las diferentes temperaturas, así como, los resultados de actividad corismato mutasa en diferentes medios, los transformantes S-cmu2 y S-cmu4 parecen ser las cepas con mayor grado de silenciamiento. En *Trichoderma* parece ser bastante común el obtener transformantes con distinto grado de silenciamiento cuando se utilizan estos *cassette* de transformación que generan horquillas de ARN (Cardoza y col., 2007; Morán-Diez y col., 2009). Cabe destacar que la cepa S-cmu1 mostraba un crecimiento similar a un desarrollo levaduriforme en las primeras 24 horas de cultivo y, posteriormente, continuaba con un desarrollo miceliar. Una observación al microscopio de esas estructuras que formaba la cepa S-cmu1 en las primeras horas de cultivo en medio sólido, permitió ver una especie de pseudoesclerocios que contenían gran cantidad de células. A su vez, ésta era la cepa que poseía el mayor número de inserciones del *cassette* de transformación.

Ya que los aminoácidos aromáticos Tyr, Phe y Trp, formados en la ruta del shikimato, serían el origen de alcoholes aromáticos como tirosol, feniletanol y triptofol pero también de compuesto como IAA y SA, que aunque son fitohormonas bien caracterizadas en planta se desconoce su papel en el hongo, se analizó la producción de compuestos como tirosol, IAA y SA en las diferentes cepas de *T. parareesei*. Aunque se detectó SA en sobrenadante de cultivo de medio PDB para las cinco cepas de *T. parareesei* analizadas mediante un método colorimétrico, no se detectó este compuesto en sobrenadante de PDB de ninguna de las seis cepas analizadas mediante HPLC-MS.



Ya que hemos detectado, mediante HPLC, bajas concentraciones (0,2 mg/L) de SA en sobrenadantes más concentrados de *T. harzianum* y que el límite de detección de esta técnica es de 0,1 mg/L, no debería pensarse que *T. parareesei* no produce SA sino que posiblemente no lo estamos detectando. Además, las significativamente menores cantidades de SA detectadas por el método colorimétrico en los transformantes silenciados S-cmu3 y S-cmu4 (el S-cmu2 no se analizó por esta técnica) que en las cepas S-cmu0 y S-cmu1 muestran que el silenciamiento del gen *Tpcm1* afecta a la producción de SA en el hongo y que esas cepas producirían menos Phe.

Por otro lado, las concentraciones de IAA detectadas por HPLC-MS en los diferentes sobrenadantes de cualquiera de las seis cepas de *T. parareesei*, entre 0,01 y 0,04 mg/L, indicarían que su producción no se ve afectada por el silenciamiento del gen *Tpcm1* en el hongo, al menos, bajo esas condiciones de cultivo. Teniendo en cuenta que el Trp es el precursor de la síntesis de compuestos indólicos en *Trichoderma* y que su adición en concentraciones del orden de 0,25 mM a un medio rico como el PDB aumenta hasta 40 veces la producción de IAA (Contreras-Cornejo y col., 2009), la ausencia de diferencias entre las cantidades de IAA detectadas en la cepa silvestre o en la cepa control en los medios PDB y MM-glucosa al 2% suplementado con 5 mM Tyr, 5 mM Phe y 2 mM de Trp, indicarían que la alta concentración de Trp en este último medio estaría inhibiendo las rutas de compuestos indólicos por las que se forman el IAA. También se ha descrito que el corismato es el sustrato por el que compiten corismato mutasa, para la síntesis de Tyr y Phe, y antranilato sintasa, para la síntesis de Trp (Sträter y col., 1997), por tanto, el silenciamiento de *Tpcm1* en *T. parareesei* supondría una mayor producción de Trp y, consecuentemente, una mayor producción de IAA en los transformantes silenciados. La ausencia de diferencias en producción de IAA entre cepas para ninguno de los tres medios utilizados indicaría que la producción de Trp se está regulando para mantenerse en equilibrio con la producción de Tyr y Phe.

A diferencia de lo ocurrido para el IAA, la cantidad de tirosol detectada mediante HPLC-MS varió para todas las cepas según el medio de cultivo en el que se habían crecido, aunque no se detectó este compuesto en sobrenadante de medio mínimo (MM-glucosa al 2%) de ninguna de las cepas. A pesar de que fueran significativamente menores las cantidades de actividad corismato mutasa obtenidas, a partir de proteínas intracelulares de medio MM-glucosa al 2%, en los silenciados S-cmu3 y S-cmu4 que en las cepas T6 y S-cmu0, la ausencia de tirosol para todas las cepas en este medio mínimo indicaría que los aminoácidos formados en la ruta del shikimato se estarían empleando en la producción de proteínas.

Cuando se cuantificó el tirosol en sobrenadantes de cultivo de medio PDB, se obtuvieron valores bastante similares en todas las cepas de *T. parareesei* (entre 0,8 y 1,1 mg/L). A tenor de la pequeña cantidad de tirosol detectada para toda las cepas, las diferencias observadas entre las cepas T6, S-cmu0 y S-cmu1 y el límite de detección de la técnica, 0,1 mg/L, no hay datos para asociar el silenciamiento del gen *Tpcm1* con la

producción de tirosol en este medio de cultivo. Sin embargo, las cantidades de tirosol producidas por los silenciados S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 en un medio MM-glucosa al 2% suplementado con los aminoácidos Tyr, Phe y Trp fueron menores que en las cepas S-cmu0. Aunque no se realizaron réplicas técnicas para las medidas por HPLC, si se partió de réplicas biológicas, por tanto, las similares cantidades de tirosol detectadas para la cepa control S-cmu0 y el transformante S-cmu1, que en la mayoría de los ensayos no se comportó como un silenciado, indicarían que las menores cantidades detectadas en las cepas S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 son debidas al silenciamiento del gen que codifica la corismato mutasa. La diferencia observada en producción de tirosol entre la cepa silvestre T6 y la cepa control S-cmu0 podría explicarse por las diferencias observadas en actividad corismato mutasa en ambas cepas, aunque sus valores de actividad eran similares en un medio MM-glucosa al 2%, se detectaron diferencias significativas cuando se adicionaba cualquiera de los tres aminoácidos aromáticos al medio de cultivo (Tabla 7). No se ha medido la actividad corismato mutasa en proteínas obtenidas a partir de medio de cultivo adicionado con los tres aminoácidos en ninguna de las cepas y, posiblemente, esos datos aclararían las diferencias observadas en la producción de tirosol entre las cepas T6 y S-cmu0.

Con objeto de analizar el papel del gen *Tpcm1* en la actividad antagonista de *T. parareesei*, se realizaron diferentes ensayos con las cepas T6 y S-cmu0 y los transformantes silenciados, y un panel de cuatro microorganismos patógenos que incluía tres hongos filamentosos (*B. cinerea*, *F. oxysporum*, *R. solani*) y un oomiceto (*P. ultimum*), todos ellos fitopatógenos de interés agrícola. Al contrario de lo que ha ocurrido con algunas especies de *Trichoderma*, donde se dispone de muchos estudios que evalúan sus habilidades antagonistas por tratarse de potenciales agentes de biocontrol (Limón y col., 1999; Brunner y col., 2003; Benítez y col., 2004; Harman y col., 2004), este tipo de estudios son muy escasos en *T. parareesei*. El motivo se debe a que, hasta su descripción (Atanasova y col., 2010), sus cepas eran identificadas como *T. reesei*, la especie filogenética más próxima y que no se caracteriza por poseer buenas habilidades antagonistas (Kubicek y col., 2011). Sin embargo, trabajos bastante recientes han mostrado que cepas de *T. parareesei* tienen potencial como agentes de biocontrol por su fuerte antagonismo frente a fitopatógenos tan diversos como *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. irregulare*, *R. solani*, *Alternaria alternata* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Druzhinina y col., 2010; Rubio y col., 2014). A su vez, y como se indicó anteriormente, el gen *Tpcm1* de *T. parareesei* se inducía en presencia de pared de *R. solani*, una situación que simula el micoparasitismo (Vizcaíno y col., 2006c, 2007; Morán-Diez y col., 2009).

Cuando se utilizaron ensayos de cultivo dual, se observaron diferencias entre cepas en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento de los cuatro fitopatógenos diana. Los transformantes silenciados S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 mostraron menor inhibición de los patógenos que las cepas T6 y S-cmu0, cuya habilidad parecía idéntica. También en este ensayo, el transformante S-cmu1 mostró diferencias con el resto de

transformantes silenciados en *Tpcm1*, y se comportaba como las cepas silvestre y control de transformación. Estos resultados indicaban que compuesto producido en la ruta del shikimato están participando en el antagonismo de *T. parareesei*. En el biocontrol de *Trichoderma* frente a los patógenos se han descrito varios mecanismos de acción (Monte, 2001; Benítez y col., 2004), los ensayos de cultivo dual muestran que la cepa silvestre T6 inhibe por antibiosis a *B. cinerea*, mientras que micoparásita a los otros tres patógenos ensayados. Sin embargo, los transformantes silenciados S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4, aunque inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* y rodeaban su colonia, no fueron capaces de sobrecrecerlo, por tanto, estas cepas poseen menor habilidades micoparasíticas.

Para profundizar en el análisis de la actividad inhibitoria de las cepas, independientemente de su micoparasitismo, se realizaron estudios utilizando membranas con diferente tamaño de poro. En los ensayos con celofán, cuyo tamaño de poro superior a 90 kDa permite el paso de cualquier compuesto secretado por el hongo, se observaron ya diferencias entre las 6 cepas incluidas en el ensayo en cuanto a su actividad para inhibir los cuatro patógenos diana. De nuevo, el transformante S-cmu4, con el mayor grado de silenciamiento, fue el más afectado en sus habilidades inhibitorias frente a los 4 fitopatógenos. El transformante S-cmu2, con un fenotipo muy similar al del transformante S-cmu4, presentó una actividad inhibitoria frente a *F. oxysporum* y *R. solani* similar a éste pero no mostró diferencias con la cepa control frente a *B. cinerea*. Por otro lado, resultan curiosos los porcentajes de inhibición obtenidos para el transformante S-cmu1 ya que aunque en muchos ensayos se comportaba como la cepa control S-cmu0, en este estudio mostró tener afectada su capacidad para inhibir a *B. cinerea* y, sobre todo, al oomiceto *P. ultimum*. Cuando los ensayos se realizaron utilizando membranas de celulosa de *cut-off* 14 kDa, que permiten sólo el paso de pequeñas moléculas, los cuatro transformantes silenciados, incluida la cepa S-cmu1, mostraron menores porcentajes de inhibición de los 4 fitopatógenos diana. Estos datos son indicativos, por un lado, de que metabolitos producidos por *T. parareesei* son responsables de la inhibición de los patógenos y, por otro, que metabolitos producidos en la ruta del shikimato participan en su actividad inhibitoria. En este sentido, metabolitos secundarios como pironas de *T. harzianum* han demostrado inhibir a *F. oxysporum* (Rubio y col., 2009), y la HA y algunas aspinolidas de *T. arundinaceum* inhibir a *B. cinerea* (Malmierca y col., 2013, 2014a).

Ya que uno de los principales mecanismos de acción de *Trichoderma* como agente de control biológico es el micoparasitismo (Lorito y col., 1998) y que muchas quitinasas, celulasas y proteasas, la mayoría de ellas inducibles, están involucradas en las habilidades micoparasíticas de este género (Vizcaíno y col., 2006c, 2007; Lorito y col., 2010), medimos estas actividades en extractos proteicos intracelulares, procedentes de cultivos en medio PDB adicionado con 0,5% de paredes celulares de *R. solani*, de la cepa silvestre y todos los transformantes. Como ocurrió en los ensayos de crecimiento utilizando el medio PDA, las cepas no mostraron diferencias de crecimiento observables

tras 48 horas de cultivo en PDA con paredes de patógeno. Sólo el transformante S-cmu4, que posee el mayor grado de silenciamiento, mostró significativamente menores actividades quitinasa y proteasa que las cepas silvestre y control. A pesar de que la mayoría de los transformantes (excepto el S-cmu2) no mostraron diferencias significativas con la cepa control en la actividad celulasa, las mayores diferencias en la capacidad inhibitoria entre los transformantes silenciados y esa cepa, obtenidas en los ensayos con membranas, se observaron frente al oomiceto *P. ultimum*. Ya que los hongos tienen una pared formada principalmente por quitina y celulosa, mientras que la de los oomicetos está constituida principalmente por celulosa, se hubiera esperado que las menores diferencias en la capacidad inhibitoria entre silenciados y cepa control se hubieran presentado frente a *P. ultimum*. En cualquier caso, como podría esperarse de hongos con poderosas actividades celolíticas, las cepas silvestre y control de transformación mostraron el mayor potencial de biocontrol frente a *P. ultimum*. Por otro lado, los resultados muestran que afectar la ruta del shikimato en el hongo tiene efecto sobre sus actividades hidrolíticas y, por tanto, sobre su micoparasitismo. En este sentido, se ha descrito que una superproducción de ROS en *T. harzianum* viene emparejada con un incremento en sus actividades hidrolíticas (quitinasa, proteasa y celulasa) y, por ende, una mayor capacidad de biocontrol de *P. ultimum* (Montero-Barrientos y col., 2011), mientras que el silenciamiento o la disrupción de un gen de la ruta biosintética de producción del trichoteceno HA conlleva un aumento de la actividad quitinasa en *T. arundinaceum* (Malmierca y col., 2012).

La rizosfera es uno de los nichos ecológicos más comunes para *Trichoderma* spp., pues las raíces de la planta les proporcionan la oportunidad para vivir como biotrofos o como saprofitos (Hermosa y col., 2004, 2012). Se ha demostrado que la sacarosa derivada de la planta facilita a *Trichoderma* la colonización de la raíz, y que un sistema permeasa/invertasa del hongo participa en la adquisición de exudados de la planta (Vargas y col., 2009). En esta tesis doctoral hemos utilizado cuantificaciones mediante *Real-time* PCR para analizar como el silenciamiento del gen *Tpcm1* afecta a la capacidad colonizadora de *T. parareesei* T6. En este sentido, se obtuvieron significativamente menores cantidades de los silenciados S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4 que de la cepa control S-cmu0 en raíces de tomate. Por otro lado, las diferencias observadas en crecimiento y actividad antagonista entre transformantes silenciados, que podían asociarse con el mayor o menor grado de silenciamiento, no se observaron en la capacidad colonizadora de estas cepas. De hecho, los transformantes S-cmu2 y S-cmu4 habían mostrado menor crecimiento en medios adicionados con exudados de plantas de tomate que el resto de las cepas y, por tanto, se hubiera esperado que presentaran una menor capacidad para colonizar raíces de tomate que el transformante S-cmu3. En cualquier caso, y como se describe en la sección de Introducción, la colonización es un proceso muy complejo (Chacón y col., 2007; Alonso-Ramírez y col., 2014). Por ejemplo en *T. parareesei* T6, como hemos publicado recientemente (Rubio y col., 2014), a las 20 horas de interacción con raíces de tomate cambia la expresión de 250 genes en su transcriptoma. Sin embargo, solo unas pocas proteínas de *Trichoderma* tales

como una endopoligalacturonasa, dos hidrofobinas y una proteína tipo expansina se han podido relacionar con la capacidad colonizadora del hongo (Viterbo y Chet, 2006; Brotman y col., 2008; Morán-Diez y col., 2009; Samolski y col., 2012).

Algunas cepas de *Trichoderma* tienen capacidad para promover el crecimiento de las plantas (Hermosa y col., 2012, 2013), aumentando la producción de los cultivos, nosotros utilizamos ensayos *in vitro* e *in vivo* para analizar los efectos que la cepa *T. parareesei* T6 y el silenciamiento del gen *Tpcm1* provocaban en plantas de tomate. En los ensayos *in vitro*, la aplicación de esta cepa al medio donde se crecían las plántulas promovía el desarrollo de raíces laterales en las mismas, el típico efecto auxina. Este resultado, publicado recientemente (Rubio y col., 2014), está de acuerdo con los efectos descritos para algunas cepas de *T. harzianum* y *T. atroviride* sobre plántulas de tomate (Rubio y col., 2012). Sin embargo, no se puede generalizar respecto a que todas las cepas de *Trichoderma* sean capaces de promover el crecimiento de las plantas, ya que se ha descrito que cepas como *T. virens* T87 provocan una disminución de raíces laterales en plántulas de tomate o que cepas de *T. reesei* inhiben el crecimiento de una planta herbácea de jardín (Atanasova y col., 2010). Estos efectos positivos sobre la arquitectura de la raíz fueron más notorios con los transformantes S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4, resultados que indicarían que algún o algunos de los compuestos formado en la ruta del shikimato del hongo afectan negativamente al crecimiento de las plántulas de tomate. En este sentido, se puede encontrar bibliografía tanto de metabolitos secundarios de *Trichoderma* que tienen fitotoxicidad, la trichodermina de *T. brevicompactum* (Tijerino y col., 2011b) o la aspinolida B de *T. arundiacum* (Malmierca y col., 2014a), como de metabolitos que tienen efectos positivos sobre el desarrollo de la planta, la aspinolida C de *T. arundinaceum* (Malmierca y col., 2014a). Cuando estos ensayos *in vitro* se realizaron bajo un estrés salino, no se observaron claras diferencias en el desarrollo de la raíz ni de parte aérea de las plántulas con ninguna de las cepas de *T. parareesei* ensayadas respecto al control.

Se hicieron ensayos con cultivos hidropónicos en los que se añadió sobrenadante de cultivo de las cepas al medio líquido donde se crecían las plántulas de tomate. A pesar de que no hubo diferencias significativas entre los valores medios obtenidos en tamaño de parte aérea y tamaño de raíz principal de las plántulas tratadas o no (control) con sobrenadante de las diferentes cepas (Tabla 16), las imágenes de la Figura 27 muestran que el sobrenadante de cualquiera de las cepas de *T. parareesei* favoreció el desarrollo de raíces laterales en plántulas de tomate de 10 días, y que estos efectos eran más evidentes con el sobrenadante del transformante S-cmu4. La ausencia de significancia en las diferencias se debe, en parte, al tipo de planta utilizada en los estudios, sus semillas no responden a la estratificación y no se puede sincronizar el tiempo de germinación, ello implica mucha variabilidad en el tamaño de las plantas.

En ensayos *in vivo* realizados en invernadero, sin y con estrés salino, el tratamiento con cualquiera de las cepas de *T. parareesei* evaluadas favoreció el

desarrollo de las plantas ya que incrementaban significativamente el tamaño de la parte aérea tanto si eran regadas con agua como cuando en su riego se utilizó una solución salina 200 mM. Algunos de estos resultados discrepan con aquellos publicados, previamente por el grupo, sobre los efectos de la cepa silvestre T6 en cultivo de tomate, donde una mayor altura de las plantas, estadísticamente significativa, se observaba solo bajo ese estrés salino (Rubio y col., 2014). En este sentido, los datos de ambos ensayos no podrían ser comparados ya que la forma de aplicación del hongo fue diferente. En aquel trabajo se pildoraron las semillas de tomate con la cepa T6, mientras que en éste las cepas se han aplicado sobre plantas de tomate de 2 semanas de edad. En cualquier caso, se sabe que los efectos que provoca *Trichoderma* en las plantas dependen no solo de la cepa, la cantidad de inóculo o el estado de desarrollo de las mismas, sino también del modo de aplicación del hongo (Hermosa y col., 2012).

En los últimos años, varios trabajos describen que los mejores efectos provocados por la aplicación de *Trichoderma* sobre la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas se observan bajo condiciones de estrés abiótico (Mastouri y col., 2010; Shores y col., 2010; Hermosa y col., 2012; Rubio y col., 2014). A pesar de que en los ensayos de invernadero no se observaron diferencias fenotípicas muy claras entre las plantas de tomate tratadas con diferentes cepas de *T. parareesei* o no (control) y, a su vez, regadas con 5 mL por planta de una solución salina 200 mM, si se observaron diferencias contundentes en el grado de clorosis y sobre todo en la caída de hoja cuando se cambió la forma de aplicar el estrés salino. El efecto de una lámina de solución salina 300 mM evidenció una mayor pérdida de hojas y un mayor grado de clorosis en las plantas control, pero también diferencias entre los tratamientos con las diferentes cepas de *T. parareesei*, siendo primero las plantas control y después las tratadas con la cepa silvestre las más afectadas por la sal. Destacar que no ocurrió caída de hojas ni clorosis elevada en plantas tratadas con los transformantes S-cmu2 o S-cmu4. Estos resultados indican que en interacciones *Trichoderma*-planta, la ruta del shikimato del hongo, por la ausencia o presencia de alguno-s producto-s generado-s en ella, afecta a las respuestas de la planta al estrés salino. Recientemente se ha publicado que cuando *Trichoderma* coloniza la planta es capaz de activar su maquinaria antioxidante, aumentando su tolerancia al estrés salino (Brotman y col., 2013).

Cuando analizamos los niveles de transcrito de tres genes marcadores de defensa frente a estreses abióticos en las plantas de tomate de 6 semanas de edad, que habían sido tratadas con el hongo en su segunda semana y que, posteriormente, habían sido sometidas a un riego con la solución salina 200 mM durante dos semanas más, los niveles de transcrito de los genes *DREB3* y *AREB2* se incrementaban, con una excepción, en las plantas tratadas con los transformantes silenciados S-cmu1, S-cmu2 o S-cmu4 respecto a los niveles detectados en sus respectivas plantas no sometidas a estrés. A pesar de que no habíamos observado diferencias fenotípicas (en tamaño o grado de clorosis) entre plantas sometidas a los diferentes tratamientos con el hongo cuando aplicamos ese nivel de estrés salino, los resultados obtenidos con genes

marcadores indicaban que el tratamiento de las plantas con cepas de *T. parareesei* silenciadas en el gen *Tpcm1* incrementaba la tolerancia de las plantas al estrés salino. Aunque no disponemos de datos de expresión de genes marcadores de defensa para aquellas plantas que se habían sometido a una lámina de riego de 300 mM de sal, las plantas tratadas con los transformantes S-cmu2 o S-cmu4 respondieron mejor a este estrés. En el caso de las plantas tratadas con la cepa T6 o la S-cmu0, mostraron perfiles de *DREB3* y *AREB2* similares, tanto en ausencia de estrés como con la aplicación de un riego de 200 mM de sal, pero siempre inferiores a los detectados en las plantas control, estos datos parecen indicar que las plantas tratadas con *T. parareesei* no están respondiendo a esos niveles de estrés. Este hecho no podría asociarse sólo a la ruta del shikimato ya que, bajo esas condiciones de estrés, las plantas tratadas con cualquiera de las cepas, silenciadas o no, tenían significativamente mayor tamaño que las plantas control.

La señalización de las respuestas a estreses abióticos en la planta es muy compleja (Zhu, 2002; Ji y col., 2013) y aunque las cascadas de traducción de señales no están completamente caracterizadas, está descrito que en la percepción de sal y de sequía está señalizada tanto por rutas dependientes de ABA como por una ruta independiente de éste (Uno y col., 2000; Agarwal y col., 2006). En este sentido, mientras el gen *AREB2*, marcador de ABA, incrementó su expresión en respuesta a la sal tanto en las plantas control como en aquellas tratadas con los transformantes silenciados, se reprimía fuertemente en las plantas tratadas con la cepa T6 o con la cepa control. A su vez, el gen *DREB3*, independiente de ABA, estuvo también fuertemente reprimido bajo el estrés salino. Estos resultados no correlacionan con la ausencia de diferencias en el fenotipo de las plantas tratadas con los diferentes transformantes o con la cepa silvestre (Tabla 17). Sin embargo, para la combinación *T. parareesei* T6 o S-cmu0-tomate, sí están de acuerdo con el modelo que describe que en la interacción *Trichoderma*-planta, compuestos producidos por el hongo modifican los niveles hormonales de la planta ayudándole a equilibrar sus respuestas de crecimiento y defensa, evitando coste energéticos innecesarios (Hermosa y col., 2012, 2013). En el caso de las interacciones con los transformantes silenciados, al tener alternada una ruta de síntesis de metabolitos, y que provocan en la plantas la modificación de las rutas dependiente e independiente de ABA, es difícil ajustar las respuestas de la planta a ese modelo porque carecemos de suficientes datos.

Cuando analizamos los niveles de expresión del gen *SOS1*, marcador de tolerancia a estrés salino (Shi y col., 2000; Olías y col., 2009), en ausencia de este estrés, los menores niveles detectados en las plantas tratadas con cualquiera de las cepas de *T. parareesei* estaría de acuerdo con su mayor crecimiento respecto al control. Por otro lado, aunque bajo estrés salino en todas las plantas tratadas con el hongo los niveles de expresión de este gen fueron menores que los de las plantas control, siempre los niveles se incrementaban respecto a los detectados en sus respectivas plantas control en mayor medida que en las plantas control (tratadas con agua). Estos resultados también

indicarían que el hongo está ayudando a balancear en la planta respuestas de crecimiento y defensa ya que, como se discutirá después, estas plantas mostraron mayor resistencia al patógeno *B. cinerea*. En cualquier caso, a tenor de las diferencias que presentaron las plantas (pérdida de hojas) cuando la sal se aplicaba situando las macetas en una lámina de solución salina 300 mM, los niveles de los marcadores *SOS1*, *AREB2* y *DREB3* deberían analizarse en plantas sometidas a niveles superiores de estrés salino.

En los ensayos *in vivo* encaminado a analizar los efectos de *T. parareesei* y del silenciamiento del gen *Tpmc1* en el hongo sobre la inducción de respuestas de defensas frente a patógenos en tomate, obtuvimos resultados diversos según el periodo que había transcurrido desde la aplicación de *Trichoderma* (Tablas 19 y 20), y también, según el patógeno diana utilizado, un necrotrofo como *B. cinerea* (Tabla 20) o un biotrofo como *Pst* (Tabla 21).

Aunque nuestro grupo ha descrito que la aplicación de la cepa T6 de *T. parareesei* aumenta la resistencia de plantas de tomate a *B. cinerea* (Rubio y col., 2014), las lesiones observadas a las 72 horas de aplicar este patógeno a hojas de plantas de tomate que 48 horas antes habían sido tratadas con cualquiera de las cepas de *T. parareesei*, fueron similares a las de las plantas control. Este resultado parecía contradecir las observaciones previas ya que mostraba que, al menos a ese tiempo, *T. parareesei* no había inducido las defensas de la planta frente a este patógeno. Sin embargo, cuando el patógeno se inoculó en plantas que habían sido tratadas 15 días antes con cualquiera de las cepas de *T. parareesei*, el tamaño de las lesiones fue significativamente menor que el observado en las plantas control y, a su vez, no hubo diferencias en la capacidad para inducir defensas en tomate frente a *B. cinerea* entre las diferentes cepas de *T. parareesei*. Estos últimos resultados están de acuerdo con aquellos previos que muestran como cepas de *T. atroviride* o *T. harzianum* inducen ISR en tomate, una defensa que es activa frente a necrotrofos (Yedidia y col., 1999; De Meyer y col., 1998; Shores y col., 2005; Korolev y col., 2008). Las diferencias en resistencia frente a *B. cinerea* que hemos observado en plantas tratadas 48 horas o 15 días antes con *T. parareesei* podrían explicarse con los cambios propuestos que provocaría *Trichoderma* en la amplitud de las respuestas defensivas de la planta frente a los patógenos (Lorito y col., 2010), que seguiría el modelo en zig-zag descrito por Jones y Dangl (2006). En este sentido, nosotros también hemos descrito que los niveles de expresión de genes marcadores de las rutas de JA, ET y SA en plantas de tomate colonizadas con *T. parareesei* T6 son ondulantes, al menos, en un periodo de tiempo de 0 a 6 días (Rubio y col., 2014).

Por otro lado, cuando analizamos los niveles de expresión de tres genes relacionados con respuestas de defensa frente a estreses bióticos, *LOX1* (ruta JA), *EIN2* (ruta ET) y *PR-1* (de respuesta a SA), en plantas de tomate de 4 semanas que había sido tratadas con *T. parareesei* en su segunda semana de edad, se observa claramente el antagonismo SA/JA descrito para las respuestas defensivas en planta (Pieterse y col.,



2009; Thaler y col., 2012). Nosotros habíamos observado una inducción de resistencia sistémica frente a *B. cinerea* por *T. parareesei*, pero los niveles de expresión de los genes *LOX1* y *EIN2*, implicados en la activación de la ISR, eran inferiores en las plantas tratadas con *Trichoderma* que los detectados en las plantas control. En este sentido, algunos trabajos también han descrito la inducción por *Trichoderma* de respuestas de defensa en planta tipo SAR (Martínez y col., 2001; Howell, 2003 y Morán-Díez y col., 2009), incluso durante largos periodos de tipo (Tucci y col., 2011), y en nuestros ensayos, las plantas tratadas con *T. parareesei* mostraron mayores niveles de *PR-1*, el gen marcador de SA, que las plantas control, resultado que indicaría que esas plantas de tomate tenían activada la defensa dependiente de SA. Este resultado junto con aquel que muestra mayor resistencia a *B. cinerea* 15 días después de haber tratado las plantas con *T. parareesei* indican que *Trichoderma* ha inducido un estado de *priming* en las plantas de tomate, situación asociada con una aplicación de cepas seleccionadas de *Trichoderma* en planta (Shoresh y col., 2005; Tucci y col., 2011; Hermosa y col., 2012; Malmierca y col., 2014a). Los estudios más recientes han confirmado que plantas tratadas con *Trichoderma* pueden desencadenar la respuesta SAR durante largos periodos de tiempo, como hemos observado nosotros con los niveles de expresión de *PR-1* observados en plantas tratadas con *T. parareesei*, pero que cuando son posteriormente infectadas por un patógeno, pueden inducir genes de la ruta del JA que provocan la represión de genes del patógeno y que desencadenan una respuesta ISR prolongada en el tiempo (Tucci y col., 2011; Malmierca y col., 2012, 2014a), algo que tiene que estar sucediendo en nuestro estudio porque las plantas tratadas con *T. parareesei* fueron más resistentes a un patógeno que solo es sensible a defensas dependientes de JA/ET.

También se utilizó un patógeno biotrofo como es Pst para analizar el papel de *T. parareesei* en la inducción de defensas en tomate. Los ensayos se realizaron con dos cepas diferentes, en dos experimentos independientes para cada una de ellas, y utilizando plantas de 2 semanas de edad, tratadas 48 horas antes con *T. parareesei*. Pst3000 es una cepa silvestre y está descrito que produce coronatina, toxina que mimetiza JA-Ile y promueve la apertura de estomas en la planta para la entrada de la bacteria, su crecimiento en el apoplasto, y la susceptibilidad sistémica y los síntomas de enfermedad en la planta (Brooks y col., 2004; Browne, 2009). Y está demostrado que esta capacidad para activar la producción de JA en la planta es una forma de reducir los niveles de SA en la misma y, por tanto, la defensa SAR a la ella es sensible (Zheng y col., 2012). Los recuentos de bacterias obtenidos a las 72 horas de inocular Pst3000 en tomate fueron, de forma general, más altos en las plantas inoculadas con cualquiera de las cepas de *T. parareesei* que aquellos obtenidos en las plantas control. Estos resultados indicarían que en las plantas tratadas con el hongo está activada la ISR. Como a su vez, aunque con alguna excepción, los recuentos de bacterias fueron superiores en plantas tratadas previamente con T6, S-cmu0 o S-cmu1 que en plantas tratadas con los transformantes silenciados S-cmu2, S-cmu3 o S-cmu4, la ruta del shikimato del hongo parece afectar al sistema de señalización de defensas de la planta.

En este caso, el silenciamiento de *Tpcm1* en *T. parareesei* está provocando en las plantas de tomate bien una menor subida de JA o bien una menor bajada de SA, respecto a los cambios que produciría las cepas silvestre y control de transformación. Nosotros hemos observado mayores niveles de expresión de *PR-1* en plantas tratadas con los transformantes silenciados que en plantas tratadas con T6 o S-cmu0, pero esos resultados se obtuvieron en plantas de otra edad (4 semanas) y el hongo se había aplicado en su segunda semana de edad, por tanto, los resultados de ambos ensayos no podrían compararse para obtener conclusiones. A su vez, las divergencias observadas entre ambos experimentos con las plantas tratadas con el transformante S-cmu1 podrían ser debidas a las diferencias que él ha mostrado en la mayoría de los ensayos. En cualquier caso, sería necesario medir los niveles de fitohormonas como JA, SA y ET, y analizar los niveles de expresión de genes como el *ICS*, que interviene en la biosíntesis de SA, para poder demostrar esta teoría. Además, esos cambios provocados en la defensa de las plantas no deberían ser asociados solo con diferencias en su capacidad para colonizar raíces de tomate ya que en un estudio realizado sobre la interacción *Arabidopsis-T. asperellum*-Pst3000 se ha observado que los cambios transcriptómicos provocados por el hongo en la planta no correlacionan con su capacidad colonizadora y que los cambios en su transcriptoma, relacionados con la defensa de la planta y provocados por la aplicación de *Trichoderma*, solo se observan tras la infección del patógeno (Brotman y col., 2012). En este sentido, nosotros observamos un *priming*, similar al que describen en ese estudio, frente a *B. cinerea* pero, a tenor de los recuentos bacterianos, no frente a Pst3000.

Por otro lado, cuando en los ensayos *in vivo* con plantas de tomate se utilizó como patógeno la cepa Pst3118 (cor<sup>-</sup>), se observó tanta variabilidad en los recuentos de bacterias entre los dos experimentos independientes que se realizaron que no permiten sacar conclusiones claras de ellos. Y, en los recuentos de bacterias de plantas sometidas a los diferentes tratamientos no hubo cambios que pudieran asociarse con *T. parareesei* o con la ruta del shikimato en el hongo.

Por último, y a la vista de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral podríamos decir que *T. parareesei*, que exhibe un amplio oportunismo ambiental, es una especie con potencial como agente de biocontrol frente a fitopatógenos. La buena capacidad de la cepa T6 para colonizar la rizosfera y provocar efectos beneficiosos en tomate muestran su potencial como biofertilizante pero también con capacidad para ayudar a la planta a balancear desarrollo y defensa. Por otro lado, la obtención y análisis de mutantes silenciados en el gen *Tpcm1* permite relacionar la corismato mutasa de *T. parareesei* T6, con sus propiedades antagonistas, su capacidad para colonizar la rizosfera y sus efectos sobre el crecimiento y las defensas de las plantas cuando interaccionan ambos organismos.

**CONCLUSIONES**

---

---



1. El gen *Tpcm1*, que codifica una corismato mutasa, se encuentra como copia única en el genoma de *T. parareesei* T6, existiendo un gen ortólogo en cepas pertenecientes a otras especies de *Trichoderma*. Además, la proteína TPCMUI posee un dominio corismato mutasa monofuncional, que se extiende desde el aminoácido 14 hasta el 262, y tiene una identidad aminoacídica de un 80-100% con la hipotética corismato mutasa de *Trichoderma* spp. y de un 76-79% con la corismato mutasa de *Fusarium* spp.
2. Los niveles de transcrito obtenidos en los estudios de expresión de *Tpcm1* en la cepa silvestre T6, inducción por déficit de nitrógeno y represión por glucosa, revelan que existe regulación a nivel transcripcional. Además, la presencia de sitios de fosforilación, glucosilación y miristilación en la estructura secundaria de la proteína TPCMUI, junto a los cambios observados en la actividad corismato mutasa como consecuencia de la adición de Tyr, Phe o Trp al medio de cultivo, muestran una regulación a nivel post-traducciona.
3. La presencia en los transformantes S-cmu (S-cmu2, S-cmu3 y S-cmu4) de *T. parareesei* T6 de varias copias del gen *ble*, de resistencia a fleomicina y que forma parte de la construcción de transformación, junto a sus menores niveles del transcrito de *Tpcm1* en un medio mínimo y a su menor actividad corismato mutasa en diferentes medios de cultivo, demuestran que éstos están silenciados en el gen *Tpcm1* y que, a su vez, poseen diferentes grados de silenciamiento.
4. Los resultados de los análisis cromatográficos (HPLC-MS) muestran que el silenciamiento del gen *Tpcm1* disminuye la producción de tirosol cuando el hongo se cultiva en un medio mínimo suplementado con los tres aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe y Trp), y relacionan a *Tpcm1* con la producción de este metabolito secundario.
5. Los menores diámetros de crecimiento observados en los transformantes silenciados S-cmu de *T. parareesei* en cuatro medios de cultivo diferentes indican que *Tpcm1* está relacionado con el metabolismo primario del hongo.
6. Los resultados obtenidos en los ensayos de antagonismo, en cultivo dual y sobre membranas con diferente tamaño de poro, realizados con las cepas T6, S-cmu0 y los transformantes silenciados S-cmu frente a los fitopatógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *R. solani* y *P. ultimum*, junto a las actividades hidrolíticas detectadas en las cepas de *T. parareesei*, relacionan la proteína TPCMUI con la producción de hidrolasas y metabolitos secundarios que, a su vez, están implicados en las habilidades antagonistas del hongo.
7. Las menores cantidades de hongo detectadas en raíces de tomate inoculadas con los transformantes silenciados en el gen *Tpcm1*, comparadas con las cuantificadas en raíces inoculadas con las cepas silvestre y control de transformación, relacionan este gen con la capacidad de *T. parareesei* para colonizar la raíz de la planta.
8. Los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* con plántulas de tomate y las diferentes cepas de *T. parareesei* o sus sobrenadantes muestran que este hongo favorece el desarrollo de raíces laterales en las plantas y, a su vez, que compuestos generados en la ruta del shikimato están participando en los efectos positivos observados.

Además, los resultados obtenidos en ensayos de invernadero demuestran que *T. parareesei* promueve el crecimiento de plantas de tomate en presencia o ausencia de un estrés salino.

9. Los porcentajes de caída de hoja y grado de clorosis obtenidos en ensayos de invernadero con plantas de tomate tratadas con *T. parareesei* y, posteriormente, sometidas a un estrés salino, muestran que este hongo incrementa en tomate la tolerancia a salinidad. A su vez, los resultados obtenidos en esos ensayos con los transformantes silenciados en *Tpcm1*, junto a los niveles de expresión en la planta de genes marcadores de rutas de señalización de respuestas a estreses abióticos, indican que la ruta de shikimato del hongo participa en la tolerancia a estrés salino inducida por *T. parareesei* en plantas de tomate.
10. El menor tamaño de lesiones necróticas observado con las inoculaciones artificiales de *B. cinerea* en hojas de plantas de tomate tratadas con las cepas silvestre o transformantes *Tpcm1* de *T. parareesei*, y los mayores recuentos de Pst3000 en plantas tratadas previamente con cualquiera de las cepas de *T. parareesei* demuestran que este hongo incrementa la resistencia de la plantas de tomate frente a un patógeno necrotrofo pero disminuye su resistencia frente a uno biotrofo. Cabe pensar, por tanto, que *T. parareesei* induce en la plantas respuestas de defensa dependientes de JA/ET. Además, las diferencias obtenidas en los recuentos de Pst3000 en plantas tratadas con la cepa silvestre o el control de transformación y plantas tratadas con los transformantes silenciados en el gen *Tpcm1* indican que la ruta del shikimato del hongo afecta a la inducción de respuestas de defensa en tomate dependientes de SA y JA.

## APÉNDICE

---





# 1. SECUENCIA DEL GEN *Tpcmu1* Y DE LA PROTEINA TPCMU1

**ATGGATTGAGCCGTCGACATGGCCGACAGCGAGCGCGCTGAATCTCACCCACATCCGCTTCCAGCTCAT**gtgagtcccatcccaagctccaaagagct 100  
 M D S A V D M A D S E R A L N L T H I R F Q L 23

ctttcgacccccgatccaagctctctcgcaagccttctgacgcgttgatccag**TCCGCTCGAAGACACAATCACGTTCCATCTGATTGAGCGAGTCCAAT** 200  
 R L E D T I T F H L I E R V Q 38

**TCCCTACAACAAG**gtgggacacggctgtccaggagaccagcattcgcttccaacaaacgaccgcgtctggagcgttactgacgtagcttctcccttcgcc 300  
 F P Y N K 43

ctttag**ACAATCTACAGCCCGCGCAATCTCCATCCCCGACAGCAAGCTCAGCTTCTTCGACTGGTACTTTTCCAGCAGGAAAAGCTGCAGTCCCTCAT** 400  
 T I Y T P G A I S I P D S K L S F F D W Y F F Q Q E K L Q S L I 75

**CCGCCGCTTCGAGTCGCCGATGAATACCCCTACTTCCCCGAGGCGCTCAGAAGCCCATCCTCAAGCGCTCAACTACCCAAGATCCTGCACAACAAC** 500  
 R R F E S P D E Y P Y F P E A V Q K P I L K P L N Y P K I L H N N 108

**ACCGTCTGCGTCAACGACAAGATTA AAAAGTTTTACATGAAAAATTTCTTGCCCAAGGTGTGCCCTGACTTTGGCCGCGAAGACCGCGCGAGGCGCAGG** 600  
 T V C V N D K I K K F Y I E K F L P K V C P D F G R E D R G E A Q 141

**AGAACTACGGCTCGACGTCCACCTGCGACATTGCCTGCCTGCAGGCCCTGTGCGGAGAATCCACTTTGGCAAGTTTGTGCGCGAGTCAAAGTCCAGTC** 700  
 E N Y G S T S T C D I A C L Q A L S R R I H F G K F V A E S K F Q S 175

**GGACCCGGAATACTACACGAAGCTCATCCAGCCGAGGACCGCGAAGCCATTGGCGAATCCATCACCAATGCGGCTGTGAGAAGCAGGTCCTCGATCGG** 800  
 D P E Y Y T K L I Q A E D R E A I G E S I T N A A V E K Q V L D R 208

**CTGCGTCTCAAGGTCGAGACGTACGGCAAGGACCGCTGCTGCTGGAAGGCGTGAGCAGCCCATCAAGATCAACGTGGACGCGCTCGTGTCCATGTACA** 900  
 L R L K V E T Y G K D P S L L E G V E Q P I K I N V D A V V S M Y 241

**AGGACTTTGTATCCATTGACCAAGGAGGTGGAGGTGGAGTACTTGATGCAGAGGCTCATACCCGAAGAGTAG** 974  
 K D F V I P L T K E V E V E Y L M Q R L I P E E 266



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK.** 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* 25: 1263-1274.
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK.** 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 657-685.
- Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ.** 2006. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* 5: 1770-1779.
- Alfano G, Ivey ML, Cakir C, Bos JIB, Miller SA, Madden LV, Kamoun S, Hoitink HAJ.** 2007. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97: 429-437.
- Almassi F, Ghisalberti EL, Narbey M.** 1991. New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod* 54: 396-402.
- Alonso-Ramírez A, Poveda J, Martín I, Hermosa R, Monte E, Nicolás C.** 2014. Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol Plant Pathol* 15: 823-831.
- Altomare C, Norvell WA, Bjorkman T, Harman GE.** 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol* 65: 2926-2933.
- Amrhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrücken HC.** 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. *Plant Physiol* 66: 830-834.
- Arisan-Atac I, Heidenreich E, Kubicek CP.** 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol Lett* 126: 249-255.
- Arvas M, Pakula T, Lanthaler K, Saloheimo M, Valkonen M, Suortti T, Robson G, Penttilä M.** 2006. Common features and interesting differences in transcriptional responses to secretion stress in the fungi *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 7: 32.
- Atanasova L, Le Crom S, Gruber S, Culpier F, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP, Druzhinina IS.** 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14: 121.
- Atanasova L, Walter M, Jaklitsch W, Komon-Zelazowska M, Kubicek CP, Druzhinina IS.** 2010. Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorina*/T. *reesei*. *Appl Environ Microbiol* 21: 7259-7267.
- Bae H, Sicher RC, Kim MS, Kim SH, Strem MD, Melnick RL, Bailey BA.** 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J Exp Bot* 60: 3279-3295.
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Roberts DP, Thomas SE, Crozier J, Holmes KA.** 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224: 1449-1464.
- Bailey BA, Korcak RF, Anderson JD.** 1993. Sensitivity to an ethylene biosynthesis inducing endoxylanase in *Nicotiana tabacum* L. cv *xanthi* is controlled by a single dominant gene. *Plant Physiol* 101: 1081-1088.
- Bailey BA y Lumsden RD.** 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. En *Trichoderma and Gliocladium. Enzymes, biological control and*

- commercial applications* (vol. 2). Kubicek CP y Harman GE (eds). Taylor & Francis, Londres, Reino Unido. pp. 185-204.
- Baird DD.** 1971. Introduction of a new broad spectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. *North Cent Weed Control Conf* 26: 64-68.
- Ballance DJ.** 1986. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2: 229-236.
- Bayram Ö, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus GH.** 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320: 1504-1506.
- Benhamou N y Chet I.** 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86: 405-416.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC.** 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7: 249-260.
- Bennett JW y Klich M.** 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16: 497-516.
- Berg A, Kemami-Wangun HV, Nkengfack AE, Schlegel B.** 2004. Lignoren, a new sesquiterpenoid metabolite from *Trichoderma lignorum* HKI 0257. *J Basic Microbiol* 44: 317-319.
- Bisset J.** 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot* 69: 2357-2372.
- Bode R y Birnbaum D.** 1991. Regulation of chorismate mutase activity of various yeast species by aromatic amino acids. *Antonie Van Leeuwenhoek* 59: 9-13.
- Bolton MD y Thomma BP.** 2008. The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. *Physiol Mol Plant Pathol* 72: 104-110.
- Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brian PW y McGowan JC.** 1945. Viridin: a highly fungistatic substance produced by *Trichoderma viride*. *Nature* 156: 144-145.
- Brooks DM, Hernández-Guzmán G, Kloek AP, Alarcón-Chaidez F, Sreedharan A, Rangaswamy V, Kunkel BN.** 2004. Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 162-174.
- Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I.** 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147: 779-789.
- Brotman Y, Landau U, Cuadros-Inostroza Á, Takayuki T, Fernie AR, Chet I, Willmitzer L.** 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLOS Pathog* 9: e1003221.
- Brotman Y, Lisek J, Méret M, Chet I, Willmitzer L, Viterbo A.** 2012. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology* 158: 139-146.
- Brown DW, Dyer RB, McCormick SP, Kendra DF, Plattner RD.** 2004. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genet Biol* 41: 454-462.
- Browse J.** 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* 60: 183-205.
- Bruce TJ y Pickett JA.** 2007. Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Curr Op Plant Biol* 10: 387-392.

- Brunner K, Peterbauer CK, Mach RL, Lorito M, Zeilinger S, Kubicek CP.** 2003. The NagI N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43: 289-295.
- Bu Y, Rho S, Kim J, Kim MY, Lee DH, Kim SY, Kim H.** 2007. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurosc Lett* 414: 218-221.
- Byng GS, Johnson JL, Whitaker RJ, Gherna RL, Jensen RA.** 1983. The evolutionary pattern of aromatic amino acid biosynthesis and the emerging phylogeny of pseudomonad bacteria. *J Mol Evol* 198: 272-282.
- Cao L, Jiang M, Zeng Z, Du A, Tan H, Liu Y.** 2008. *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard [*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey] in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere* 71: 1769-1773.
- Caporale AG, Sommella A, Lorito M, Lombardi N, Azam SM, Pigna M, Ruocco M.** 2014. *Trichoderma* spp. alleviate phytotoxicity in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) irrigated with arsenic-contaminated water. *J Plant Physiol* 171: 1378-1384.
- Cardoza RE, Hermosa MR, Vizcaíno JA, González F, Llobell A, Monte E, 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 Genet Biol* 44: 269-283.
- Cardoza RE, Hermosa MR, Vizcaíno JA, Sanz L, Monte E, Gutiérrez S.** 2005. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. En *Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol*. Mellado E y Barredo JL (eds). Research Signpost, Kerala, India. pp. 1-22.
- Cardoza RE, Malmierca MG, Gutiérrez S.** 2014. Overexpression of *erg1* gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413: effect on the induction of tomato defence-related genes. *Appl Environ Microbiol* 117: 812-823.
- Cardoza RE, Malmierca MG, Hermosa MR, Alexander NJ, McCormick SP, Proctor RH, Gutiérrez S.** 2011. Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthesis genes in filamentous fungi of the genus *Trichoderma*. *Appl Environ Microbiol* 77: 4867-4877.
- Cardoza RE, Vizcaíno JA, Hermosa MR, Monte E, Gutiérrez S.** 2006a. A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast and *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Microbiol Seoul* 44: 383-395.
- Cardoza RE, Vizcaíno JA, Hermosa MR, Sousa S, González FJ, Llobell A, Monte E, Gutiérrez S.** 2006b. Cloning and characterization of the *erg1* gene of *Trichoderma harzianum*: effect of the *erg1* silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine. *Fungal Genet Biol* 43: 164-178.
- Carreras-Villaseñor N, Sánchez-Arreguín JA, Herrera-Estrella AH.** 2012. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* 158: 3-16.
- Casalone E, Colella CM, Daly S, Fontana S, Torricelli I, Polsinelli M.** 1994. Cloning and characterization of a sulphite-resistance gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1101-1110.
- Chacón M, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell A, Delgado-Jarana J.** 2007. Microscopic and transcriptome analysis of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol* 10: 19-27.

- Chambergo FS, Bonaccorsi ED, Ferreira AJ, Ramos AS, Ferreira Junior JR, Abrahao-Neto J, Farah JP, El-Dorry H.** 2002. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem* 277: 13983-13988.
- Chang YC, Baker R, Kleifeld O, Chet I.** 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* 70: 145-148.
- Chaverri P, Castlebury LA, Samuels GJ, Geiser DM.** 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol* 27: 302-313.
- Chaverri P, Samuels GJ, Stewart EL.** 2001. *Hypocrea virens* sp nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* 93:1113-1124.
- Chen H y Fink GR.** 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* 20: 1150-1161.
- Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR.** 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5048-5052.
- Chen L, Yang X, Raza W, Li J, Liu Y, Qiu M, Shen Q.** 2011. *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Appl Environ Microbiol Biotechnol* 89: 1653-1663.
- Chet I, Benhamou N, Haran S.** 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 2). Kubicek CP y Harman GE (eds). Taylor & Francis, Londres, Reino Unido. pp. 153-172.
- Chet I.** 1987. *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En *Innovative approaches to plant disease control*. Chet I (ed). J. Willey y Sons, Nueva York, EE.UU. pp. 137-160.
- Chinworrungsee M, Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Chuailua P, Suksamrarn A.** 2008. Cytotoxic activities of trichothecenes isolated from an endophytic fungus belonging to order Hypocreales. *Arch Pharm Res* 31: 611-616.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ.** 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814.
- Chong H, Lee J, Guan KL.** 2001. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J* 20: 3716-3727.
- Chook YM, Gray JV, Ke H, Lipscomb WN.** 1994. The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J Mol Biol* 240: 476-500.
- Claydon N, Allan M, Hanson JR, Avent AG.** 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Trans Br Mycol Soc* 88: 503-513.
- Claydon N, Hanson JR, Truneh A, Avent AG.** 1991. Harzianolide, a butenolide metabolite from cultures of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry* 30: 3802-3803.
- Collins RP y Halim AF.** 1972. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.). *J Agric Food Chem* 20: 437-438.
- Connelly JA y Conn EE.** 1985. Tyrosine biosynthesis in *Sorghum bicolor*: isolation and regulatory properties of arogenate dehydrogenase. *Z Naturforsch C* 41: 69-78.



- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, López-Bucio J.** 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149: 1579-1592.
- Contreras-Esquivel JC y Voget CE.** 2004. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J Biotech* 110: 21-28.
- Cooney JM y Lauren DR.** 1999. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. *J Nat Prod* 62: 681-683.
- Cortés C, Gutiérrez A, Olmedo V, Inbar J, Chet I, Herrera-Estrella A.** 1998. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Mol Gen Genet* 260: 218-225.
- Covas MI, Konstantinidou V, Mysytaki E, Fitó M, Weinbrenner T, De La Torre R, Lamuela-Raventós R.** 2003. Postprandial effects of wine consumption on lipids and oxidative stress biomarkers. *Drugs Exp Clin Res* 29: 217-223.
- Dana DM, Limón MC, Mejías R, Mach RL, Benítez T, Pintor-Toro JA, Kubicek CP.** 2001. Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* 38: 335-342.
- Dana DM, Pintor-Toro JA, Cubero B.** 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* 142: 722-730.
- Daniel JFDS y Rodrigues F.** 2007. Peptaibols of *Trichoderma*. *J Nat Prod* 24: 1128-1141.
- Daoubi M, Pinedo-Rivilla C, Rubio MB, Hermosa R, Monte E, Aleu J, Collado IG.** 2009. Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma* spp. *Tetrahedron* 69: 4834-4840.
- Daum M, Herrmann S, Wilkinson B, Bechthold A.** 2009. Genes and enzymes involved in bacterial isoprenoid biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 13: 180-188.
- Davidson BE y Hudson GS.** 1987. Chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 142: 440-450.
- De Boer L, Vrijbloed JW, Grobgen G, Dijkhuizen L.** 1989. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in the ribulose monophosphate cycle methylotroph *Nocardia* sp. 239. *Arch Microbiol* 151: 319-325.
- De Jonge R, van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MH, Thomma BP.** 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin triggered immunity in plants. *Science* 329: 953-955.
- De la Cruz J, Pintor JA, Benítez T, Llobel A.** 1995a. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J Bacteriol* 177: 1864-1871.
- De la Cruz J, Pintor JA, Benítez T, Llobel A, Romero LC.** 1995b. A novel endo  $\beta$ -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* 177: 6937-6945.
- De la Puerta R, Domínguez M, Ruíz-Gutiérrez V, Flavill JA, Hoult JRS.** 2001. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitergic neurotransmission. *Life Sci* 69: 1213-1222.

- De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, Höfte M.** 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 104: 279-286.
- Degenkolb T, Kirschbaum J, Bruckner H.** 2007. New sequences, constituents, and producers of peptaibiotics: an updated review. *Chem Biodivers* 4: 1052-1067.
- Delgado-Jarana J, Sousa S, González F, Rey M, Llobell A.** 2006. *ThHog1* controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 152: 1687-1700.
- Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF.** 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book* 9: e0156.
- Deng S, Lorito M, Penttilä M, Harman GE.** 2007. Overexpression of an endochitinase gene (*ThEn-42*) in *Trichoderma atroviride* for increased production of antifungal enzymes and enhanced antagonist action against pathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol* 142: 81-94.
- Derengowski LS, De-Souza-Silva C, Braz SV, Mello-De-Sousa TM, Bão SN, Kyaw CM, Silva-Pereira I.** 2009. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8: 13.
- Desjardins AE y Protor RH.** 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int J Food Microbiol* 119: 47-50.
- Diener SE, Dunn-Coleman N, Foreman P, Houfek TD, Teunissen PJM, Solingen P, Dean RA.** 2004. Characterization of the protein processing and secretion pathways in a comprehensive set of expressed sequence tags from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol Lett* 230: 275-282.
- Djonovic S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM.** 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interac* 19: 838-853.
- Djonovic S, Vargas WA, Kolomiets MV, Horndeski M, Wiest A, Kenerley CM.** 2007. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol* 145: 875-889.
- Dodd SL, Lieckfeldt E, Samuels GJ.** 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40.
- Dodds PN y Rathjen JP.** 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539-548.
- Donoso EP, Bustamante RO, Carú M, Niemeyer HM.** 2008. Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Appl Environ Microbiol* 74: 1412-1417.
- Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Atanasova L, Seidl V, Kubicek CP.** 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 IS, Kopchinskiy A, Kubicek CP.** 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Kubicek CP.** 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9: 749-759.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J.** 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* 135: 1893-1902.

- Dunlop RW, Simon A, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL.** 1989. An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. *J Nat Prod* 52: 67-74.
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA.** 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Mol Cell Biol* 4: 457-467.
- Eberhard J, Ehrler TT, Epple P, Felix G, Raesecke HR, Amrhein N, Schmid J.** 1996. Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties. *Plant J* 10: 815-821.
- Elad Y, Barak R, Chet I.** 1984. Parasitism of esclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol Biochem* 16: 381-386.
- El-Katatny MH, Gudelj M, Robra KH, Elnaghy MA, Gubitz GM.** 2001. Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 137-143.
- Engelberth J, Koch T, Schüler G, Bachmann N, Rechtenbach J, Boland W.** 2001. Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiol* 125: 369-377.
- Evidente A, Cabras A, Maddau L, Serra S, Andolfi A, Motta A.** 2003. Viridepyronone, a new antifungal 6-substituted 2H-pyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. *J Agricul Food Chem* 51: 6957-6960.
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Flores A, Chet I, Herrera-Estrella A.** 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr Genet* 31: 30-37.
- Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Ward M.** 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 278: 31988-31997.
- Freimoser FM, Screen S, Bagga S, Hu G, St Leger RJ.** 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 149: 239-247.
- Friedl MA y Druzhinina IS.** 2012. Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology* 158: 69-83.
- Furukawa T, Koga J, Adachi T, Kishi K, Syono K.** 1996. Efficient conversion of L-tryptophan to indole-3-acetic acid and/or tryptophol by some species of *Rhizoctonia*. *Plant Cell Physiol* 37: 899-905.
- Gams W, Van der Aa HA, Van der Okaats-Niterink AJ, Samson RA, Stalpers JA.** 1987. CBS Course of mycology. Centralbureau voor Schimmel cultures, Berna, Suiza.
- Geremia RA, Goldman GH, Jacobs D, Ardrtes W, Vila SB, Montagu M, Herrera-Estrella A.** 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol Microbiol* 8: 603-613.
- Ghisalberti EL, Hockless DCR, Rowland C, White AH.** 1992. Harziandione, a new class of diterpene from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod* 55: 1690-1694.
- Ghisalberti EL.** 2002. Anti- infective agents produced by the hyphomycetes genera *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Curr Med Chem Anti Infective Agents* 1: 343- 374.

- Giovannini L, Migliori M, Filippi C, Origlia N, Panichi V, Falchi M, Bertelli AA, Bertelli A.** 2002. Inhibitory activity of the white wine compounds, tyrosol and caffeic acid, on lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor alpha release in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Tissue React* 24:53-56.
- Glazebrook J.** 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205-227.
- Golder WS y Watson TR.** 1980. Lanosterol derivatives as precursors in the biosynthesis of viridin. Part 1. *J Chem Soc Perkin Trans* 1: 422-425.
- Goldman GH, Pellizzon CH, Marins GH, McInerney JO, Goldman MHS.** 1998. *Trichoderma* spp. genome and gene structure. En *Trichoderma and Gliocladium*. Kubicek CP y Harman GE (eds). Taylor & Francis, Londres, Reino Unido. pp: 209-224.
- Gómez-González B, García-Rubio M, Bermejo R, Gaillard H, Shirahige K, Marín A, Foiani M, Aguilera A.** 2011. Genome-wide function of THO/TREX in active genes prevents R-loop-dependent replication obstacles. *EMBO J* 30: 3106-3119.
- Gori K, Knudsen PB, Nielsen KF, Arneborg N, Jespersen L.** 2011. Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 11: 643-652.
- Goswami J, Pandey RK, Tewari JP, Goswami BK.** 2008. Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. *J Environ Sci Health B* 43: 237-240.
- Graden JA, Posewitz MC, Simon JR, George GN, Pickering IJ, Winge DR.** 1996. Presence of a copper(I)-thiolate regulatory domain in the copper-activated transcription factor Amt1. *Biochemistry* 46: 14583-14589.
- Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, Goodstein D, Kuo A, Minovitsky S, Nikitin R, Ohm RA, Otilar R, Poliakov A, Ratnere I, Riley R, Smirnova T, Rokhsar D, Dubchak I.** 2011. The genome portal of the department of energy joint genome institute. *Nucleic Acids Res* 40: 26-32.
- Gronzona I, Hermosa R, Tejada M, Gomis MD, Mateos PF, Bridge PD, Monte E, Garcia-Acha I.** 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* 63: 3189-3198.
- Grover A.** 2012. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critic Rev Plant Sci* 31: 57-73.
- Gruber S y Seidl-Seiboth V.** 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158: 26-34.
- Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Barredo JL, Díez B, Martín JF.** 1997. Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* 48: 606-614.
- Hadibarata T, Tachibana S, Itoh K.** 2007. Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Pak J Biol Sci* 10: 2535-2543.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Appl Microbiol* 166: 557-580.
- Handelsman J y Stabb EV.** 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8: 1855-1869.

- Harman GE, Bjorkman T, Ondik KL, Shores M.** 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks Pest Manage* 19: 24-29.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M.** 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2:43-56.
- Harman GE.** 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research in *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* 84: 377-393.
- Harman GE.** 2006. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- Hazelwood LA, Daram JM, VanMaris AJA, Pront JT, Dickinson JR.** 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74: 2259-2266.
- Helmstaedt K, Krappmann S, Braus GH.** 2001. Allosteric regulation of catalytic activity: *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase versus yeast chorismate mutase. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 404-421.
- Hermosa MR, Cardoza RE, Rubio B, Gutiérrez S, Monte E.** 2014. *Trichoderma*: Their uses and application in bioengineering and biotechnology. En: *Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of Trichoderma*. Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Druzhinina I, Upadhyay RS y Tuohy M. Elsevier, Amsterdam, Holanda. pp. 125-137.
- Hermosa MR, Grondona I, Diaz-Minguez JM, Iturriaga EA, Monte E.** 2001a. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr Genet* 38: 343-350.
- Hermosa MR, Grondona I, Llobell A, Monte E.** 2001b. Composición que comprende hongos del género *Trichoderma* útil como agente de control biológico y sus aplicaciones. Pantete PCT/ESO 01/00166.
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E, Garcia-Acha I.** 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol* 66: 1890-1898.
- Hermosa MR, Grondona I, Monte E.** 1999. Isolation of *Trichoderma harzianum* Th2 from commercial mushroom in Spain. *Plant Dis* 83: 591.
- Hermosa MR, Keck E, Chamorro I, Rubio B, Sanz L, Vizcaino JA, Grondona I, Monte E.** 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol Res* 108: 897-906.
- Hermosa R, Lorito M, Woo SL, Monte E.** 2011. Proteomic approaches to understand *Trichoderma* biocontrol mechanisms and plant interactions. *Curr Proteomics* 7: 289-305.
- Hermosa R, Rubio B, Cardoza RE, Nicolás C, Monte E, Gutierrez S.** 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int Microbiol* 16: 69-80.
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E.** 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.
- Herrmann KM y Weaver I.** 1999. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Biol* 50: 473-503.
- Herrmann KM.** 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. En: Amino acids: biosynthesis and genetic regulation. Herrmann KM y Somerville RL (eds). Addison-Wesley, London, Reino Unido. pp. 301-322.
- Herrmann KM.** 1995. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.

- Hoffmann PJ, Doy CH, Catcheside DE.** 1972. The separation of three allosterically inhibitable 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthases from extracts of *Neurospora crassa* and the purification of the tyrosine inhibitable isoenzyme. *Biochim Biophys Acta Enzymol* 268: 550-561.
- Hoffmeister D y Keller NP.** 2007. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *J Nat Prod* 24: 393-416.
- Holwerda BC y Rogers JC.** 1992. Purification and characterization of aleurain: a plant thiol protease functionally homologous to mammalian cathepsin H. *Plant Physiol* 99: 848-855.
- Horst RJ, Zeh C, Saur A, Sonnewald S, Sonnewald U, Voll LM.** 2012. The *Ustilago maydis* Nit2 homolog regulates nitrogen utilization and is required for efficient induction of filamentous growth. *Eukaryot Cell* 11: 368-380.
- Howell CR.** 1999. Selective isolation from soil and separation *in vitro* of P and Q strains of *Trichoderma virens* with differential media. *Mycologia* 91:930-934.
- Howell CR.** 2003. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* 87: 4-7.
- Howell CR.** 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96: 178-180.
- Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD, Puckhaber LS.** 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248-252.
- Howell CR y Stipanovic RD.** 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85: 469-472.
- Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J.** 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol Control* 51: 409-416.
- Huang G, Dong R, Allen REX, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS.** 2005. Two chorismate mutase genes from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol Plant Pathol* 6: 23-30.
- Hubbard JP, Harman GE, Hadar Y.** 1983. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds *Pisum sativum*. *Phytopathology* 73: 655-659.
- Hui JP, Lanthier P, White TC, McHugh SG, Yaguchi M, Roy R, Thibault P.** 2001. Characterization of cellobiohydrolase I (Cel7A) glycoforms from extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr* 752: 349-368.
- Hung R, Lee S, Bennett JW.** 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol* 6: 19-26.
- Ilmén M, Thrane C, Penttilä M.** 1996. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol Gen Genet* 251: 451-460.
- Inbar J y Chet I.** 1996. The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv Exp Med Biol* 408: 229-231.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Ishii T, Nonaka K, Suga T, Masuma R, Ōmura S, Shiomi K.** 2013. Cytosporone S with antimicrobial activity, isolated from the fungus *Trichoderma* sp. FKI-6626. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 679-681.
- Jaworski EG.** 1972. Mode of action of *N*-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J Agricult Food Chem* 20: 1195-1198.

- Jen WC, Jones GA, Brewer D, Parkinson VO, Taylor A.** 1987. The antibacterial activity of alamethicins and zervamicins. *J Appl Bacteriol* 63: 293-298.
- Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X.** 2013. The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol Plant* 6: 275-286.
- Jiménez-Díaz RM, Melgarejo P, Bonnaterra A, Landa BB, Monte E y Montesinos E.** 2010a. Manejo integrado de enfermedades causadas por hongos. En “*Enfermedades de las plantas causadas por hongos y/o oomicetos*”. Jiménez-Díaz RM y Montesinos E (eds). Phytoma, Valencia, España. pp. 87-114.
- Jiménez-Díaz I, Ballesteros O, Zafra-Gómez A, Crovetto G, Vilchez JL, Navalon A, Verge C, de Ferrer JA.** 2010b. New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils. *Chemosphere* 80: 248-255.
- Jones DT.** 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292: 195-202.
- Jones JD y Dangl JL.** 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Ju W, Yoo BC, Kim IJ, Kim JW, Kim SC, Lee HP.** 2009. Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high density oligonucleotide microarrays. *Oncol Res* 18: 47-56.
- Katayama A y Matsumura F.** 1993. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulphan, by *Trichoderma harzianum*. *Environ Toxicol Chem* 12: 1059-1065.
- Kazan K y Manners JM.** 2012. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* 17: 22-31.
- Kazan K y Manners JM.** 2013. MYC2: the master in action. *Mol Plant* 6: 686-703.
- Keller NP, Turner G, Bennett JW.** 2005. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3: 937-947.
- Kennedy J, Auclair K, Kendrew SG, Park C, Vederas JC, Hutchinson CR.** 2009. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* 284:1368-1372.
- Kimura M, Tokai T, Takahashi-Ando N, Ohsato S, Fujimura M.** 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2105-2123.
- King EO, Ward WK, Raney DE.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44: 301-307.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA.** 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. CABI, Wallingford, Reino Unido.
- Klein D y Eveleigh DE.** 1998. Ecology of *Trichoderma*. En *Trichoderma and Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics (vol. 1) Kubicek CP y Harman GE (eds). Taylor & Francis, Londre, Reino Unido. pp. 57-73.
- Knaggs AR.** 2001. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep* 18: 334-355.
- Komon-Zelazowska M, Neuhof T, Dieckmann R, von Döhren H, Herrera-Estrella, A, Kubicek CP, Druzhinina IS.** 2007. Formation of atroviridin by *Hypocrea atroviridis* is conidiation associated and positively regulated by blue light and the G protein GNA3. *Eukaryot Cell* 6: 2332-2342.
- Koornneef A y Pieterse CMJ.** 2008. Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiol* 146: 839-844.

- Korolev N, David DR, Elad Y.** 2008. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma* induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Biocontrol* 53: 667-683.
- Kradolfer P, Niederberger P, Hütter R.** 1982. Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of two aromatic aminotransferases. *Arch Microbiol* 133: 242-248.
- Krappmann S, Helmstaedt K, Gerstberger T, Eckert S, Hoffmann B, Hoppert M, Braus GH.** 1999. The *aroC* gene of *Aspergillus nidulans* codes for a monofunctional, allosterically regulated chorismate mutase. *J Biol Chem* 274: 22275-22282.
- Kubicek CP, Bissett C, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G.** 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol* 38: 310-319.
- Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK, Mukherjee M, Kredics L, Alcaraz LD, Aerts A, Antal Z, Atanasova L, Cervantes-Badillo MG, Challacombe J, Chertkov O, McCluskey K, Couplier F, Deshpande N, von Döhren H, Ebbole DJ, Esquivel-Naranjo EU, Fekete E, Flipphi M, Glaser F, Gómez-Rodríguez EY, Gruber S, Han C, Henrissat B, Hermosa R, HernándezOñate M, Karaffa L, Kosti I, Le Crom S, Lindquist E, Lucas S, Lübeck M, Lübeck PS, Margeot A, Metz B, Misra M, Nevalainen H, Omann M, Packer N, Perrone G, Uresti-Rivera EE, Salamov A, Schmoll M, Seiboth B, Shapiro H, Sukno S, Tamayo-Ramos JA, Tisch D, Wiest A, Wilkinson HH, Zhang M, Coutinho PM, Kenerley CM, Monte E, Baker SE, Grigoriev IV.** 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol* 12: R40.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Borner T, Kubicek CP.** 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7755-7760.
- Kyte J y Doolittle RF.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132.
- Leeman M, den Ouden FM, van Pelt JA, Dirkx FPM, Steijl H, Bakker PAHM, Schippers B.** 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86:149-155.
- Leon-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Körbes AP, Memelink J, Pieterse CMJ, Ritsema T.** 2009. Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 187-197.
- Li DC.** 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360.
- Li HL y Guo H.** 2007. Molecular basis of the ethylene signaling and response pathway in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul* 26: 106-117.
- Li J, Chen S, Zhu L, Robert L.** 1995. Isolation of cDNAs encoding the tryptophan pathway enzyme indole-3-glycerol phosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 108: 877-878.
- Li L, Bagley D, Ward DM, Kaplan J.** 2008. Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol Cell Biol* 28: 1326-1337.
- Lieckfeldt E, Samuels GJ, Nirenberg HI, Petrini O.** 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl Environ Microbiol* 65: 2418-2428.



- Limón MC, Chacón MR, Mejías R, Delgado-Jarana J, Rincón AM, Codón AC, Benítez T.** 2004. Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 675-685.
- Limón MC, Pintor-Toro JA, Benítez T.** 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89: 254-261.
- Liu PG y Yang Q.** 2005. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Res Microbiol* 156: 416-423.
- Livak KJ y Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Lo CT, Nelson EB, Harman GE.** 1996. Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* 80: 730-741.
- Lora JM, de la Cruz J, Llobell A, Benítez T, Pintor-Toro JA.** 1995. Molecular characterization and heterologous expression of an endo-b-1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol Gen Genet* 247: 639-645.
- Lorenzo O y Solano R.** 2005. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* 8: 532-540.
- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL, Di Pietro A.** 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Lorito M, Hayes CK, Woo SL, Harman GE.** 1994. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan  $\beta$ -1,3-glucosidase and a N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84: 302-307.
- Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F.** 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7860-7865.
- Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E.** 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'Omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* 48: 395-417.
- Lu Z, Tombolini R, Woo SL, Zeilinger S, Lorito M, Jansson JK.** 2004. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Appl Environ Microbiol* 70: 3073-3081.
- Lütke-Eversloh T y Stephanopoulos G.** 2007. L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 103-110.
- Lysøe E, Pasquali M, Breakspear A, Kistler HC.** 2011. The transcription factor FgStuAp influences spore development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 54-67.
- Mach RL y Zeilinger S.** 1998. Genetic transformation of *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1). Kubicek CP y Harman GE (eds). Taylor & Francis, Londres, Reino Unido. pp. 225-242.
- Mach RL, Schindler M, Kubicek CP.** 1994. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet* 25: 567-570.
- Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M, Kubicek CP.** 1996. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol* 21: 1273-1281.

- Maeda H, Sano M, Maruyama Y, Tanno T, Akao T, Totsuka Y, Endo M, Sakurada R, Yamagata Y, Machida M, Akita O, Hasegawa F, Abe K, Gomi K, Nakajima T, Iguchi Y.** 2004. Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 74-83.
- Mai B y Breeden L.** 1997. Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol Cell Biol* 17: 6491-6501.
- Maischak H, Zimmermann M, Felle HH, Boland W, Mithöfer A.** 2010. Alamehycin-induced electrical long distance signaling in plants. *Plant Signal Behav* 5: 988-890.
- Malmierca MG, Barua J, McCormick SP, Izquierdo-Bueno I, Cardoza R, Hermosa R, Alexander NJ, Collado IG, Gutiérrez S.** 2014a. Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defense priming. *Environ Microbiol* (doi:10.1111/1462-2920.12514).
- Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Collado IG, Hermosa R, Monte E, Gutierrez S.** 2013. Relevance of trichothecenes in fungal physiology: disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genet Biol* 53: 22-33.
- Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Hermosa RM, Monte E, Gutiérrez S.** 2012. Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Appl Environ Microbiol* 78: 4856-4868.
- Malmierca MG, McCormick SP, Cardoza RE, Alexander NJ, Monte E, Gutiérrez S.** 2014b. Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. *Environ microbial* (doi:10.1111/1462-2920.12506).
- Marra R, Ambrosino P, Carbone V, Vinale F, Woo SL, Roucco M, Ciliento R, Lanzuise S, Ferraioli S, Soriente I, Gigante S, Turrà D, Fogliano V, Scala F, Lorito M.** 2006. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr Genet* 50: 307-321.
- Martínez C, Blanc F, Le Claire E, Besnard O, Nicole M, Baccou JC.** 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol* 127: 334-344.
- Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EG, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barabote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS.** Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnol* 26: 553-560.
- Mastouri F, Bjorkman T, Harman GE.** 2010. Seed treatments with *Trichoderma harzianum* alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* 100: 1213-1221.
- Masunaka A, Hyakumachi M, Takenaka S.** 2011. Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ* 26: 128-134.

- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ.** 2011. Trichothecenes: from simple to complex Mycotoxins. *Toxins* 3: 802-814.
- McDonald T, Brown D, Keller NP, Hammond TM.** 2005. RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 539-545.
- Mercado-Blanco J, Van der Drift KM, Olsson PE, Thomas-Oates JE, Van Loon, LC, Bakker PA.** 2001. Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J Bacteriol* 1: 909-1920.
- Migheli Q, González-Candelas L, Dealessi L, Camponogara A, Ramón-Vidal D.** 1998. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the  $\beta$ -1,4-Endoglucanase gene *eglI* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Biol Control* 88: 673-677.
- Miller JH.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
- Miyake T, Loch CM, Li R.** 2002. Identification of a multifunctional domain in autonomously replicating sequence-binding factor 1 required for transcriptional activation, DNA replication, and gene silencing. *Mol Cell Biol* 22: 505-516.
- Mohamed SA, Farid NM, Hossiny EN, Bassuiny RI.** 2006. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *J Biotech* 127: 54-64.
- Montanes FM, Pascual-Ahuir A, Proft M.** 2011. Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Mol Microbiol* 79: 1008-1023.
- Monte E.** 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* 4: 1-4.
- Montero M, Sanz L, Rey M, Llobell A, Monte E.** 2007. Cloning and characterization of *bgn16.3*, coding for a  $\beta$ -1,6-glucanase expressed during *Trichoderma harzianum* mycoparasitism. *J Appl Microbiol* 103: 1291-1300.
- Montero M, Sanz L, Rey M, Monte E, Llobell A.** 2005. BGN16.3, a novel acidic beta-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *FEBS J* 272: 3441-3448.
- Montero-Barrientos M, Cardoza RE, Gutiérrez S, Monte E, Hermosa MR.** 2007. The heterologous overexpression of *hsp23*, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. *Curr Genet* 52: 45-53.
- Montero-Barrientos M, Hermosa R, Cardoza RE, Gutiérrez S, Monte E.** 2011. Functional analysis of the *Trichoderma harzianum nox1* gene, encoding an NADPH oxidase, relates production of reactive oxygen species to specific biocontrol activity against *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol* 77: 3009-3016.
- Montero-Barrientos M, Hermosa R, Cardoza RE, Gutiérrez S, Nicolás C, Monte E.** 2010. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *J Plant Physiol* 167: 659-665.
- Morán-Diez E, Hermosa R, Ambrosino P, Cardoza RE, Gutiérrez S, Lorito M, Monte E.** 2009. The *ThPG1* endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 1021-1031.

- Morán-Diez E, Rubio B, Domínguez S, Hermosa R, Monte E, Nicolás C.** 2012. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *J Plant Physiol* 169: 614-620.
- Mukherjee M, Hadar R, Mukherjee PK, Horwitz BA.** 2003. Homologous expression of a mutated  $\beta$ -tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *J Appl Microbiol* 95: 861-867.
- Mukherjee PK y Kenerley CM.** 2010. Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a VELVET protein, Vel1. *Appl Environ Microbiol* 76: 2345-2352.
- Mukherjee PK, Buensanteai N, Morán-Diez ME, Druzhinina IS, Kenerley CM.** 2012. Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetase (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveal a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. *Microbiology* 158: 155-165.
- Mukherjee PK, Wiest A, Ruiz N, Keightley A, Moran-Diez ME, McCluskey K, Pouchus YF, Kenerley CM.** 2011. Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *J Biol Chem* 286: 4544-4554.
- Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJM, Habelstrup Kh, Gupta KJ.** 2013. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* 5, pls052.
- Murashige T y Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Muthumeenakshi S, Mills PR, Brown AE, Seaby DA.** 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiol* 140: 769-777.
- Naito K, Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraiishi T, Ichinose Y.** 2008. Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1165-1174.
- NAS.** 1987. Regulating Pesticides in Food. National Academy of Sciences. Washington DC. EE.UU.
- Nasser D, Henderson G, Nester EW.** 1969. Regulated enzymes of aromatic amino acid synthesis: control, isozymic nature, and aggregation in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol* 98: 44-50.
- Nelson MA, Kang S, Braun EL, Crawford ME, Dolan PL, Leonard PM, Mitchell J, Armijo AM, Bean L, Blueyes E, Cushing T, Errett A, Fleharty M, Gorman M, Judson K, Miller R, Ortega J, Pavlova I, Perea J, Todisco S, Trujillo R, Valentine J, Wells A, Werner-Washburne M, Yazzie S, Natvig DO.** 1997. Expressed sequences from conidial, mycelial and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 21: 348-363.
- Neumann MJ y Dobinson KF.** 2003. Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet Biol* 38: 54-62.
- Nicolás C, Hermosa R, Rubio B, Mukherjee PK, Monte E.** 2014. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant Sci* (doi: 10.1016/j.plantsci.2014.03.005).
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10: 1-6.

- Nimmo GA y Coggins JR.** 1981. The purification and molecular properties of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Neurospora crassa*. *Biochem* 197: 427-436.
- O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine F R, Ciardi J, Klee HJ.** 2001. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J* 25: 315-323.
- O'Hara A y Jenkins GI.** 2012. *In vivo* function of tryptophans in the *Arabidopsis* UV-B photoreceptor UVR8. *Plant Cell* 24: 3755-3766.
- Olías R, Eljakaoui Z, Li J, De Morales PA, Marín-Manzano MC, Pardo JM, Belver A.** 2009. The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na<sup>+</sup> between plant organs. *Plant Cell Environ* 32: 904-916.
- Ordentlich A, Wiesman Z, Gottlieb HE, Cojocaru M, Chet I.** 1992. Inhibitory furanone produced by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry* 31: 485-486.
- Osborn A.** 2010. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet* 26: 449-457.
- Paulitz TC.** 1990. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. En *New directions in biological control: Alternatives for supressing agricultural pests and diseases*. Baker RR & Dunn PE (eds). Alan R. Liss, Nueva York, EE.UU. pp.713-724.
- Pearson WR, Lipman DJ.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448.
- Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E, Knowles J.** 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61: 155-164.
- Persoon CH.** 1794. Dispositio methodica fungorum in Classes, Ordines, Familias et Genera. En *Neues Magazin für die Botanik*. Römer, J. J. (ed). Ziegler und Söhne, Zürich, Alemania. pp. 63-128.
- Peterbauer C, Litscher D, Kubicek CP.** 2002. The *Trichoderma atroviride seb1* (stress response element binding) gene encodes an AGGGG-binding protein which is involved in the response to high osmolarity stress. *Mol Genetics and Genomics* 268: 223-231.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM.** 2009: Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nature Chem Biol* 5: 308-316.
- Pimentel C, Vicente C, Menezes RA, Caetano S, Carreto L, Rodrigues-Pousada C.** 2012. The role of the Yap5 transcription factor in remodeling gene expression in response to Fe bioavailability. *PLOS One* 7(5): e37434, (doi:10.1371/journal.pone.0037434).
- Pittard AJ.** (1996). Biosynthesis of aromatic amino acids. En *Escherichia coli and Salmonella, cellular and molecular biology*. Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin, ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M y Umbarger HE (eds). The American Society for Microbiology. Washington DC, EE. UU. pp. 458-484.
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H.** 2009. MAPK cascade signaling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12: 421-426.
- Poole PR, McLeod LC, Whitmore KJ, Whitaker G.** 1996. Periharvest control of *Botrytis cinerea* rots in stored kiwifruit. *Acta Hort ISHS* 464: 71-78.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T.** 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23: 4878-4884.

- Raeder U y Broda P.** 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1: 17-20.
- Rahman Z, Shida Y, Furukawa T, Suzuki Y, Okada H, Ogasawara W, Morikawa Y.** 2009. Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular  $\beta$ -glucosidase I. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 1083-1089.
- Ravagnani A, Gorfinkiel L, Langdon T, Diallinas G, Adjadj E, Demais S, Gorton D, Arst HN, Scazzocchio C.** 1997. Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *EMBO J* 16: 3974-3986.
- Reese ET, Siu RG, Levinson HS.** 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol* 59: 485.
- Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG.** 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Rev Phytochemistry* 7: 89-123.
- Reissing JL, Strominger JL, Leloir LF.** 1955. A modified colorimetric method for estimation of N-acetilamine sugars. *Biol Chem* 27: 959-966.
- Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, Peissl I, Seidl V, Krska R, Zeilinger S.** 2005. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet Biol* 42: 749-760.
- Reithner B, Schuhmacher R, Stoppacher N, Pucher M, Brunner K, Zeilinger S.** 2007. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase *Tmk1* differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genet Biol* 44: 1123-1133.
- Ries L, Belshaw NJ, Ilmén M, Penttilä ME, Alapuranen M, Archer DB.** 2014. The role of CRE1 in nucleosome positioning within the *cbh1* promoter and coding regions of *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 749-762.
- Rifai MA.** 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* 116: 1-56.
- Rippert P, Matringe M.** 2002. Molecular and biochemical characterization of an *A. thaliana* aroenate dehydrogenase with two highly similar and active domains. *Plant Mol Biol* 48: 361-368.
- Rippert P, Puyaubert J, Grisolle D, Derrier L, Matringe M.** 2009. Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149: 1251-1260.
- Roberts CW, Roberts F, Lyons RE, Kirisits MJ, Mui EJ, Finnerty J, McLeod R.** 2002. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *J Infect Dis* 185: 525-536.
- Rocha-Ramirez V, Omero C, Chet I, Horwitz BA, Herrera-Estrella A.** 2002. *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell* 1: 594-605.
- 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.
- Rosado IV, Rey M, Codon AC, Govantes J, Moreno-Mateos MA, Benítez T.** 2007. QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genet Biol* 44: 950-964.
- Rosgaard L, Pedersen S, Langston J, Akerhielm D, Cherry JR, Meyer AS.** 2007. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. *Biotechnol Prog* 23: 1270-1276.

- Rotblat B, Enshell-Seijffers D, Gershoni JM, Schuster S, Avni A.** 2002. Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J* 32: 1049-1055.
- Roth S y Schüller HJ.** 2001. Cat8 and Sip4 mediate regulated transcriptional activation of the yeast malate dehydrogenase gene MDH2 by three carbon source-responsive promoter elements. *Yeast* 2: 151-162.
- Rubio MB, Cardoza RE, Hermosa R, Gutiérrez S, Monte E.** 2008. Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr Genet* 54: 301-312.
- Rubio MB, Domínguez S, Monte E, Hermosa R.** 2012. Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology* 158: 119-128.
- Rubio MB, Hermosa R, Keck E, Monte E.** 2005. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microb Ecol* 49: 25-33.
- Rubio MB, Hermosa R, Reino JL, Collado IG, Monte E.** 2009. *Thctf1* transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genet Biol* 46: 17-27.
- Rubio MB, Quijada NM, Pérez E, Domínguez S, Monte E, Hermosa R.** 2014. Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *Appl Environ Microbiol* 80: 1864-1873.
- Ruocco M, Lanzuise S, Vinale F, Marra R, Turrà D, Woo SL, Lorito M.** 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 291-301.
- Sadfi-Zouaoui N, Hannachi I, Rouaissi M, Hajlaoui MR, Rubio MB, Monte E, Boudabous A, Hermosa R.** 2009. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Can J Microbiol* 55: 154-162.
- Sakai M, Hirata H, Sayama H, Sekiguchi K, Itano H, Asai T, Watanabe N.** 2007. Production of 2-phenylethanol in roses as the dominant floral scent compound from L-phenylalanine by two key enzymes, a PLP-dependent decarboxylase and a phenylacetaldehyde reductase. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2408-2419.
- Sambrook J y Russell D.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3<sup>a</sup> edición. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.
- Samolski I, de Luis A, Vizcaíno JA, Monte E, Suárez MB.** 2009. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiol* 9: 217.
- Samolski I, Rincón AM, Pinzón LM, Viterbo A, Monte E.** 2012. The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158: 129-138.
- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Catebury LA, Petrini O.** 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170.
- Sanz L, Montero M, Grondona I, Vizcaíno JA, Llobell A, Hermosa R, Monte E.** 2004. Cell-wall degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr Genet* 46: 277-286.
- Sarver A y DeRisi J.** 2005. Fzf1p regulates an inducible response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16: 4781-4791.

- Savoia D, Avanzini C, Alice T, Callone E, Guella G, Dini F.** 2004. Antimicrobial activity of euplotin C, the sesquiterpene taxonomic marker from the marine ciliate *Euplotes crassus*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3828-3833.
- Scarselletti R y Faull JL.** 1994. *In vitro* activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycol Res* 98: 1207-1209.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM.** 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11655-11660.
- Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Harman, GE, Kubicek CP.** 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 60: 4364-4370.
- Schmidheini T, Moesch HU, Evans JN, Braus G.** 1990. Yeast allosteric chorismate mutase is locked in the activated state by a single amino acid substitution. *Biochemistry* 29: 3660-3668.
- Schnappauf G, Sträter N, Lipscomb WN, Braus GH.** 1997. A glutamate residue in the catalytic center of the yeast chorismate mutase restricts enzyme activity to acidic conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8491-8496.
- Schuster A, Bruno KS, Collett JR, Baker SE, Seiboth B, Kubicek CP, Schmoll M.** 2012. A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels* 5: 1.
- Segarra G, Casanova E, Avilés M, Trillas I.** 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microb Ecol* 59: 141-149.
- Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena MA, Oliveira E, Trillas I.** 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* T34. *Proteomics* 7: 3943-3952.
- Segarra G, Van der Ent S, Trillas I, Pieterse CMJ.** 2009. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol* 11: 90-96.
- Seidl V, Gamauf C, Druzhinina IS, Seiboth B, Hartl L, Kubicek CP.** 2008. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics* 9: 327.
- Seidl V, Marchetti M, Schandl R, Allmaier G, Kubicek CP.** 2006. Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J* 273: 4346-4359.
- Seidl V, Seibel C, Kubicek CP, Schmoll M.** 2009. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13909-13914.
- Shaban GM y El-Komy HM.** 2001. Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. in Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. *Mycopathologia* 151: 139-146.
- Shi H, Kim Y, Guo Y, Stevenson B, Zhu JK.** 2003. The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell* 15: 19-32.
- Shores M y Harman GE.** 2008. Genome-wide identification, expression and chromosomal location of the genes encoding chitinolytic enzymes in *Zea mays*. *Mol Genet Genom* 280: 173-185.



- Shoresh M, Mastouri F, Harman G.** 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48: 21-43.
- Shoresh M, Yedidia I, Chet I.** 2005. Involvement of the jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Shtienberg D y Elad Y.** 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87: 332-340.
- Singh J, Rimek D, Kappe R.** 2005. *In vitro* susceptibility of 15 strains of zygomycetes to nine antifungal agents as determined by the NCCLS M38-A microdilution method. *Mycoses* 48: 246-250.
- Singh S, Braus-Stromeier SA, Timpner C, Tran VT, Lohaus G, Reusche M, Braus GH.** 2010. Silencing of *Vlaro2* for chorismate synthase revealed that the phytopathogen *Verticillium longisporum* induces the cross-pathway control in the xylem. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1961-1976.
- Sivasithamparam K y Ghisalberti EL.** 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1). Kubicek CP y Harman GE (eds). Taylor & Francis, Londres, Reino Unido. pp. 139-191.
- Skinner W, Keon J, Hargreaves J.** 2001. Gene information for fungal plant pathogens from expressed sequences. *Curr Opin Microbiol* 4: 381-386.
- Smith TF y Waterman MS.** 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 147: 195-197.
- Somogyi M.** 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195: 19-23.
- Sousa S.** 2004. Mejora del sistema de expresión en *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la producción de proteínas de interés biotecnológico. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla España.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Pieterse CM.** 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760-770.
- Stasz TE, Nixon K, Harman GE, Weeden NF, Kuter GA.** 1989. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozymes polymorphism. *Mycologia* 81: 391-403.
- Steiger MG, Vitikainen M, Uskonen P, Brunner K, Adam G, Pakula T, Penttilä M, Saloheimo M, Astrid R, Mach-Aigner AR.** 2011. Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Appl Environ Microbiol* 77: 114-121.
- Strater N, Hakansson K, Schnappauf G, Braus G, Lipscomb WN.** 1996. Crystal structure of the T state of allosteric yeast chorismate mutase and comparison with the R state. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3330-3334.
- Sträter N, Schnappauf G, Braus G, Lipscomb WN.** 1997. Mechanisms of catalysis and allosteric regulation of yeast chorismate mutase from crystal structures. *Structure* 5: 1437-1452.
- Studholme DJ, Harris, B, Le Cocq K, Winsbury R, Perera V, Ryder L, Ward JL, Beale MH, Thornton CR, Grant M.** 2013. Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture-insights from genomics. *Front Plant Sci* 4: 1-13.

- Suárez B, Rey M, Castillo P, Monte E, Llobell A.** 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 46-55.
- Suárez MB, Sanz L, Chamorro MI, Rey M, Gonzalez FJ, Llobell A, Monte E.** 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet Biol* 42: 924-934.
- Tamaoki M.** 2008. The role of phytohormone signaling in ozone-induced cell death in plants. *Plant Signal Behav* 3: 166-174.
- Tarus PK, Lang'at-Thoruwa CC, Wanyonyi AW, Chhabra SC.** 2003. Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. *B Chem Soc Ethiopia* 17: 185-190.
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK.** 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 17: 260-270.
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK.** 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 17: 260-270.
- Thomma BP, Nürnberger T, Joosten MH.** 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23: 4-15.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Tijerino A, Cardoza RE, Moraga J, Malmierca MG, Vicente F, Aleu J, Collado IG, Monte E, Gutiérrez S, Hermosa R.** 2011a. Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genet Biol* 48: 285-296.
- Tijerino A, Hermosa R, Cardoza RE, Moraga J, Malmierca MG, Aleu J, Collado IG, Monte E, Gutiérrez 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.
- Trail F, Xu JR, Miguel PS, Halgren RG, Corby Kistler H.** 2003. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet Biol* 38: 187-197.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Bisignano G.** 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2474-2478.
- Tsuda K y Katagiri F.** 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 13: 459-465.
- Tucci M, Ruocco M, De Masi L, De Palma M, Lorito M.** 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol Plant Pathol* 12: 341-354.
- Twumasi-Boateng K, Yu Y, Chen D, Gravelat FN, Nierman WC, Sheppard DC.** 2009. Transcriptional profiling identifies a role for Br1A in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 8:104-115.
- Tzin V y Galili G.** 2010. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant* 3: 956-972.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal

- transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11632-11637.
- Vadassery J, Ranf S, Drzewiecki C, Mithöfer A, Mazars C, Scheel D, Oelmüller R.** 2009. A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *Plant J* 59: 193-206.
- van Zeijl CMJ, van de Kamp EHM, Punt PJ, Selten GCM, Hauer B, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ.** 1998. An improved colony-PCR method for filamentous fungi for amplification of PCR-fragments of several kilobases. *J Biotech* 59: 221-224.
- Vanholme B, Haegeman A, Jacob J, Cannoot B, Gheysen G.** 2009. Arabinogalactan endo-1, 4- $\beta$ -galactosidase: a putative plant cell wall-degrading enzyme of plant-parasitic nematodes. *Nematology* 11: 739-747.
- Vargas WA, Mandawe JC, Kenerley CM.** 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol* 151: 792-808.
- Venugopal SC, Jeong RD, Mandal MK, Zhu S, Chandra-Shekara AC, Xia Y, Hersh M, Stromberg AJ, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P.** 2009. Enhanced disease susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling. *PLoS Genet* 5: e1000545.
- Vinale F, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Marra R, Ritieni A, Ferracane R, Woo S, Lorito M.** 2009. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol* 48: 705-711.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M.** 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol Biochem* 40: 1-10.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Ruocco M, Wood S, Lorito M.** 2012. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat Prod Commun* 7: 1545-1550.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Woo SL, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Ruocco M, Lanzuise S, Manganiello G, Lorito, M.** 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol J* 8: 127-139.
- Viterbo A y Chet I.** 2006. *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* 7: 249-258.
- Viterbo A, Haran S, Friesem D, Ramot O, Chet I.** 2001. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiol Lett* 200: 169-174.
- Viterbo A, Landau U, Kim S, Chernin L, 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, Montero M, Ramot O, Friesem D, Monte E, Llobell A, Chet I.** 2002. Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr Genet* 42: 114-122.
- Viterbo A, Wiest A, Brotman Y, Chet I, Kenerley C.** 2007. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Mol Plant Pathol* 8: 737-746.
- Vizcaíno JA, Cardoza RE., Dubost, L., Bodo, B., Gutiérrez, S. y Monte, E.** 2006a. Detection of peptaibols and partial cloning of a putative peptaibol synthetase gene from *T. harzianum* CECT 2413. *Folia Microbiol* 51: 114-120.

- Vizcaíno JA, Cardoza RE, Hauser M, Hermosa R, Rey M, Llobell A, Becker JM, Gutiérrez S, Monte E.** 2006b. *ThPTR2*, a di/tri-peptide transporter gene from *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genet Biol* 43: 234-246.
- Vizcaíno JA, González FJ, Suárez MB, Redondo J, Heinrich J, Delgado-Jarana J, Hermosa R, Gutiérrez S, Monte E, Llobell, Rey, M.** 2006c. Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genom* 7: 193.
- Vizcaíno JA, Redondo J, Suárez MB, Cardoza RE, Hermosa MR, González FJ, Rey M, Monte E.** 2007. Generation, annotation and analysis of ESTs from for different *Trichoderma* strain grown under condition related to biocontrol. *Appl Microbiol Biotech* 75: 853-862.
- Vizcaíno JA, Sanz L, Cardoza RE, Monte E, Gutiérrez S.** 2005. Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microbiol Lett* 244: 139-148.
- Vogt T.** 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* 3: 2-20.
- Walther K y Schuller HJ.** 2001. Adr1 and Cat8 synergistically activate the glucose-regulated alcohol dehydrogenase gene *ADH2* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147: 2037-2044.
- Webster J.** 1980. Introduction to Fungi, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge. Reino Unido.
- Weindling R.** 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22: 837-845.
- Weiss U y Edwards MJ.** 1980. The biosynthesis of aromatic amino acids. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, Waterhouse PM.** 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581-590.
- Whitaker RJ, Berry A, Byng GS, Fiske MJ, Jensen RA.** 1985. Clues from *Xanthomonas campestris* about the evolution of aromatic biosynthesis and its regulation. *J Mol Evol* 21: 139-149.
- Wiest A, Grzegorski D, Xu BW, Goulard C, Rebuffat S, Ebbole DJ, Bodo B, Kenerley C.** 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem* 277: 20862-20868.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM.** 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.
- Wilhite SE, Lumsden RD, Straney DC.** 2001. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol* 67: 5055-5062.
- Woo SL y Lorito M.** 2006. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. En *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management*. Vurro M y Gressel J (eds), Springer, Amsterdam, Holanda. pp. 107-130.
- Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M.** 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96: 181-185.
- Xie BB, Qin QL, Shi M, Chen LL, Shu YL, Lu Y, Wang XW, Rong JC, Gong Z, Li D, Sun C, Liu G, Dong X, Pang X, Huang F, Liu W, Chen X, Zhou B, Zhang, Song XY.** 2014. Comparative genomics provide insights into evolution of *Trichoderma* nutrition style. *Genome Biol Evol* 6: 379-390.
- Yedidia I, Benhamou N, Chet II.** 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1061-1070.

- Yedidia I, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I.** 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol Biochem* 38: 863-873.
- Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y, Chet I.** 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235: 235-242.
- Yu JH y Keller N.** 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* 43: 437-458.
- Zamioudis C y Pieterse CM.** 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 139-150.
- Zamir D y Chet I.** 1985. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Can J Bot* 31: 578-580.
- Zeilinger S, Ebner A, Marosits T, Mach R, Kubicek CP.** 2001. The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Mol Gen Genomics* 1: 56-63.
- Zeilinger S, Reithner B, Scala V, Peissl I, Lorito M, Mach RL.** 2005. Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1591-1597.
- Zeilinger S.** 2004. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr Genet* 45: 54-60.
- Zhang X, Wang C, Zhang Y, Sun Y, Mou Z.** 2012. The *Arabidopsis* mediator complex subunit 16 positively regulates salicylate-mediated systemic acquired resistance and jasmonate/ethylene-induced defense pathways. *Plant Cell* 24: 4294-4309.
- Zhou XX, Li J, Yang YH, Zeng Y, Zhao PJ.** 2014. Three new koninginins from *Trichoderma neokongii* 8722. *Phytochem Lett* 8: 137-140.
- Zhu JK.** 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.