

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



**Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen
Thpg1 de *Trichoderma harzianum***

María Eugenia Morán Díez

2008



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Thpg1* de *Trichoderma harzianum*

Memoria presentada por María Eugenia Morán Díez para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas

Salamanca, 24 de julio de 2008

Enrique Monte Vázquez, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, y **M. Rosa Hermosa Prieto**, Profesor Doctor Contratado Permanente del mismo Departamento,

CERTIFICAMOS:

Que la memoria titulada “**Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Thpg1* de *Trichoderma harzianum***” presentada por María Eugenia Morán Diez para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos este certificado en Salamanca a 24 de julio de 2008.

Fdo.: Enrique Monte Vázquez

Fdo.: M. Rosa Hermosa Prieto

Ángel Domínguez Olavarri, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Thpg1* de *Trichoderma harzianum*”** presentada por María Eugenia Morán Díez para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. Enrique Monte Vázquez y 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 24 de julio de 2008.

Fdo.: Ángel Domínguez Olavarri

“No te inclines ante la adversidad, más bien oponte audazmente a ella, tanto cuanto tu suerte te lo permita”

Virgilio (poeta de la antigua Roma)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer que ahora pueda estar escribiendo estas palabras a muchas personas que han estado conmigo durante estos años de Tesis.

Quiero dar las gracias a Enrique y a Rosa, mis directores de Tesis, por darme la oportunidad de trabajar con vosotros. Gracias Enrique por tu optimismo, incluso en los momentos más difíciles, siempre brujuleando en busca de soluciones y por creer en mis posibilidades desde el principio. Gracias Rosa por tu paciencia (sobre todo al comienzo), por encontrar siempre unos minutos de tu escaso tiempo para echarme una mano y por escucharme cuando lo he necesitado. Muchas gracias a los dos.

De manera general quiero dar las gracias a toda la gente con la que he compartido horas de laboratorio, antes en el CB208 y ahora en el L2. En particular a la persona con la que más horas he compartido, gracias Marta, por dedicarme parte de tu tiempo a solucionar mis dudas científicas, por tantas charlas y “cigarros” compartidos (y frío también), por tu buen humor (y también por el malo), no me cabe la menor duda de que algún día serás una gran directora de tesis (no les des mucha caña). Gracias al resto de compañeros/as que en algún u otro momento han estado ahí, y con los que he compartido buenos momentos, con los que aún siguen y con los que ya se fueron: Belén Rubio, Belén Suárez, Isabel Grondona, Isabel Chamorro, Emma, Álvaro, Juanan, Luis, Marcela, Natalia, Sara, Ilanit, Rebeca, Mariela. Con algunas he compartido muchas horas de comidas y agradables charlas en estos últimos meses; gracias por las clases de comida internacional peruana, costarricense y varias más, aunque todavía nadie ha superado a los pimientos rellenos.

También quiero agradecer a la gente de Fisiología Vegetal su inestimable ayuda. En particular, a Ana, compañera de recta final de tesis; gracias por tu amistad y por aguantar mis penas. Gracias también a Carlos, David, Chuchi y Rocío, por su buen humor y por su ayuda con el complejo mundo de la fisiología vegetal (las hormonas vegetales me han traído de cabeza). Y del otro lado del pasillo, a Loli y Mari-Paz por aconsejarme al principio de mi andadura en este mundo de la investigación.

A toda la gente del pasillo en el edificio “viejo”, con la que he compartido muchas risas, sobre todo a Raúl por tener siempre la frase que me alegraba algunas mañanas; a Lorena, Paula, Inma (por esas cortas charlas de pasillo), y al resto de la gente de los laboratorios de al lado. No quiero olvidarme de M^a Eugenia, gracias por preocuparte por mí en los malos momentos, espero que puedas regresar a tu país con una tesis bajo el brazo.

No me quiero olvidar de Manoli y Paco, siempre dispuestos a echar una mano, sobre todo al principio, cuando llegamos a este estupendo edificio llamado CIALE. A todos con los que estos últimos meses he compartido charlas en la sala de precarios

sobre lo maravilloso que es el mundo de la investigación: Raúl, Jose, Sergio, Blanca, etc., y al resto de la gente de los laboratorios vecinos.

Gracia a la gente que desde fuera de Salamanca también han hecho posible esta memoria. A Santi y Rosa Elena, por su gran ayuda con esos transformantes que se resistían y por su hospitalidad cuando he estado con ellos. A Cándido y Enrique Quesada por ayudarme con los tediosos trámites burocráticos y por preocuparse desde la distancia.

No quiero olvidarme de esas personas con las que he vivido durante estos años en Salamanca y que ya forman parte de mi familia: Natalia, Angélica, Raquel, Nuria y Ruth. Muchas gracias a todas por vuestra amistad, a algunas por aguantarme durante tantos años compartiendo piso (no fue tan malo, ¿verdad?), tantas risas y alguna que otra pena. Gracias Nuria por escucharme en los últimos meses, los más difíciles de la Tesis.

Y sobre todo, quiero dar las gracias a las personas que más han contribuido a la realización de esta Tesis, a mi familia, por ser lo más bonito de mi vida, por no dudar nunca de mis decisiones, por darme la mejor herencia que se puede recibir, la educación. Gracias por estar ahí y por vuestra compañía en esos momentos que necesitaba desconectar del trabajo, gracias de todo corazón a todos, Alicia, Narciso, Tere, Edu, M^a Teresa y Eugenio.

No quiero terminar estas palabras sin dar las gracias a mi amiga “paciencia”, gracias por no cejar en el empeño siempre junto a mí.

Una vez llegados a este punto parece que el duro camino de escribir una Tesis Doctoral llega a su fin, ahora comienza lo mejor, el papeleo.

“En algún lugar sobre el arco iris, los cielos son azules y los sueños que te atreves a soñar se vuelven realidad. Algún día pediré un deseo a una estrella y despertaré muy lejos de las nubes dejándolas atrás, donde los problemas son como gotas de limón... Si los pájaros vuelan alegremente más allá del arco iris... ¿por qué yo no podría?”

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

A mi familia

Siglas y abreviaturas

2D-PAGE	electroforesis bidimensional en gel de acrilamida
ABA	ácido abséísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	análisis de la varianza
APS	persulfato amónico
ARN	ácido ribonucleico
ARNc	ácido ribonucleico complementario
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	atmósferas
ATP	adenosín trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
CaMV	virus del mosaico de la coliflor
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes</i>
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CHAPS	ácido 3[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]propanosulfónico
CIA	cloroformo-alcohol isoamílico
CM	carboximetilcelulosa
c.s.p.	cantidad suficiente para
CWDEs	<i>cell wall degrading enzymes</i>
dCTPs	desoxicitosina trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
D.O.	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EC	<i>Enzyme Commission number</i>
EDTA	ácido etilendiamino-tetracético
EE.UU.	Estados Unidos
endoPGs	endopoligalacturonasas
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
exoPGs	exopoligalacturonasas
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
g	gramos
g	aceleración de la gravedad terrestre
GTP	guanosina-5-trifosfato
h	horas
HGA	homogalacturonano
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución

IEE	isoelectroenfoque
IMI	<i>International Mycological Institute</i>
IPTG	isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
ISR	respuesta sistémica inducida
ITS	<i>internal transcribed region</i>
JA	ácido jasmónico
JGI	<i>Joining Genome Institute</i>
kb	kilobase
kDa	kilodalton
kV	kilovoltio
kΩ	kiloohmio
L	litro
mg	miligramo
mL	mililitro
M	molaridad
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i>
Mb	megabase
MM	medio mínimo
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico
μF	microfaraday
μm	micrometro
NAG	N-acetil- β -D-glucosamina
NBT	Newbiotechnic
NCBI	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
NJ	<i>neighbour-joining</i>
nm	nanometros
OGAs	oligogalacturónidos
ORF	fase de lectura abierta
PAGE	electroforesis en gel de acrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PGs	poligalacturonasas
PGA	ácido poligalacturónico
PGIPs	proteínas inhibidoras de poligalacturonasas
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
ppm	partes por millón
p/v	peso/volumen
RAPD	<i>random amplification of polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RG	ramnogalacturonano
RISC	<i>RNA-inducing silencing complex</i>
RISR	repuesta sistémica inducida por rizobacterias

RNAsa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SA	ácido salicílico
SAR	respuesta sistémica adquirida
SCAR	<i>sequence characterized amplified region</i>
SDS	dodecil sulfato sódico
siRNA	ácido ribucleico de interferencia
spp.	especies
TCA	ácido tricloroacético
T-DNA	ADN de transferencia
Tris	tri-(hidroximetil)-aminometano
U	unidad de actividad enzimática
UV	ultravioleta
V	voltio
v/v	volumen/volumen
X	número de veces de concentración
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido

Aminoácidos

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

Bases nitrogenadas

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

INTRODUCCIÓN	1
1. BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Trichoderma</i>	2
1.1. Morfología	2
1.2. Sistemática	3
1.3. Ecología	4
2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE <i>Trichoderma</i> COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO	5
2.1. Micoparasitismo	5
2.1.1. <u>Quitinasas</u>	7
2.1.2. <u>Glucanasas</u>	8
2.1.3. <u>Proteasas</u>	9
2.2. Antibiosis	10
2.3. Competencia con el patógeno	11
2.4. Promoción del crecimiento de las plantas	12
2.5. Inducción de mecanismos de resistencia en plantas	12
3. APLICACIONES DEL GÉNERO <i>Trichoderma</i>	14
4. SISTEMA PECTINOLÍTICO DE HONGOS FILAMENTOSOS	15
4.1. Estructura de la pectina	16
4.2. Clasificación de las pectinasas	19
4.3. Endopoligalacturonasas fúngicas	20
5. GENÓMICA FUNCIONAL	26
5.1. Concepto	26
5.2. Genómica funcional de hongos filamentosos	27
5.3. Genómica funcional de <i>Trichoderma</i>	28
6. ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA	30
6.1. Silenciamiento génico	30
6.2. Expresión en sistemas homólogos y heterólogos	32
6.3. Tecnología de <i>microarrays</i>	32
6.4. Proteómica	33
OBJETIVOS	34

MATERIALES Y MÉTODOS	36
1. ORGANISMOS UTILIZADOS	37
1.1. Bacterias	37
1.2. Hongos filamentosos	37
1.2.1. <u>Cepas de <i>Trichoderma</i></u>	37
1.2.2. <u>Hongos fitopatógenos</u>	37
1.3. Material vegetal	37
2. VECTORES	38
2.1. Vectores plasmídicos	38
2.2. Vectores fágicos	40
3. MEDIOS DE CULTIVO	41
3.1. Medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos	41
3.2. Medios de cultivo para hongos	42
3.3. Medios de cultivo para plantas	44
4. CULTIVO DE LOS ORGANISMOS	45
4.1. <i>Trichoderma</i>	45
4.1.1. <u>Recogida de esporas</u>	45
4.1.2. <u>Cultivo para la obtención de germinulas</u>	45
4.1.3. <u>Cultivos para la extracción de ADN</u>	45
4.1.4. <u>Cultivos para el análisis de la expresión génica</u>	45
4.1.5. <u>Cultivos para el análisis de la expresión génica en un sistema de tres componentes</u>	47
4.1.6. <u>Cultivos para la obtención de proteínas intracelulares en un sistema de tres componentes</u>	47
4.2. <i>A. thaliana</i>	47
4.2.1. <u>Desinfección de semillas</u>	47
4.2.2. <u>Cultivo en placa</u>	47
4.2.3. <u>Cultivo en maceta</u>	48
4.2.4. <u>Cultivo en medio líquido</u>	48
4.3. Tomate	48
4.3.1. <u>Desinfección de semillas</u>	48
4.3.2. <u>Cultivo en tubos</u>	48

5. MANTENIMIENTO	49
5.1. Bacterias	49
5.2. Hongos filamentosos	49
5.3. Bacteriófagos	49
5.4. Plantas	49
6. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	50
6.1. Construcción del vector pJL43b1- <i>Thpg1</i>	50
6.2. Construcción del vector pBI121- <i>Thpg1</i>	50
7. TRANSFORMACIÓN DE ORGANISMOS	53
7.1. Transformación de bacterias	53
7.1.1. <i>E. coli</i>	53
7.1.1.1. Preparación de células competentes	53
7.1.1.2. Transformación	53
7.1.2. <i>A. tumefaciens</i>	54
7.1.2.1. Preparación de células competentes	54
7.1.2.2. Transformación	54
7.2. Transformación de hongos filamentosos	55
7.2.1. <u>Preparación de protoplastos</u>	55
7.2.2. <u>Transformación</u>	56
7.3. Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i>	56
7.3.1. <u>Transformación</u>	56
7.3.2. <u>Selección de semillas transgénicas</u>	57
8. MANIPULACIÓN DE BACTERIÓFAGOS	58
8.1. Preparación de bacterias para la transducción	58
8.2. Infección de células con el bacteriófago <i>lambda</i>	58
8.3. Aislamiento de calvas de lisis de fagos en medio sólido	58
8.4. Amplificación de fagos en medio sólido	58
9. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	59
9.1. Extracción de ADN	59
9.1.1. <u>Extracción de ADN plasmídico de bacterias</u>	59
9.1.1.1. Minipreparaciones (<i>boiling minipreps</i>)	59
9.1.1.2. Lisis alcalina a pequeña escala	60
9.1.1.3. Lisis alcalina a gran escala	60

9.1.2. <u>Extracción de ADN del bacteriófago <i>lambda</i></u>	60
9.1.3. <u>Extracción de ADN genómico de <i>Trichoderma</i></u>	61
9.1.3.1. Extracción a pequeña escala	61
9.1.3.2. Extracción a gran escala	62
9.1.4. <u>Extracción de ADN genómico de <i>A. thaliana</i></u>	62
9.1.4.1. Extracción rápida	62
9.1.4.2. Extracción a gran escala	63
9.2. Extracción de ARN	63
9.2.1. <u>Método del Tri Reagent</u>	63
9.2.2. ARN para <i>microarrays</i>	63
10. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	64
10.1. Cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos	64
10.1.1. <u>En ensayos generales</u>	64
10.1.2. <u>En <i>microarrays</i></u>	64
10.2. Manipulación enzimática de ácidos nucleicos	64
10.2.1. <u>Tratamiento enzimático de ADN</u>	64
10.2.1.1. Digestión	64
10.2.1.2. Generación de extremos romos	65
10.2.1.3. Defosforilación de plásmidos	65
10.2.1.4. Ligación	65
10.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	66
10.3.1. <u>Reacción clásica</u>	66
10.3.2. <u>Reacción de cadena larga</u>	66
10.3.3. <u>Reacción con polimerasa de alta fidelidad</u>	66
10.3.4. <u>RT-PCR</u>	67
10.3.5. <u>PCR a tiempo real (<i>Real Time</i> PCR)</u>	67
10.3.6. <u>Oligonucleótidos empleados en este trabajo</u>	68
10.4. Electroforesis de ácidos nucleicos	70
10.4.1. <u>Electroforesis de ADN</u>	70
10.4.2. <u>Electroforesis de ARN</u>	70
10.4.2.1. En condiciones no desnaturalizantes (geles de agarosa)	70
10.4.2.2. En condiciones desnaturalizantes (geles de agarosa-formaldehído)	71
10.5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	71
10.6. Secuenciación de ADN	71
10.7. <i>Primer walking</i>	72
11. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN EN MEMBRANA	72
11.1. Transferencia de ácidos nucleicos a membrana	72
11.1.1. <u>Transferencia de ADN de geles de agarosa (<i>Southern blot</i>)</u>	72
11.1.2. <u>Transferencia de ARN de geles de agarosa (<i>Northern blot</i>)</u>	73

11.1.3. <u>Transferencia de ADN de bacteriófagos (escrutinio)</u>	73
11.2. <u>Marcaje de sondas</u>	73
11.2.1. <u>Marcaje radiactivo de ADN</u>	73
11.2.2. <u>Marcaje no radiactivo de ADN</u>	74
11.2.3. <u>Marcaje de ADNc con uracilo biotilado</u>	74
11.3. <u>Prehibridación, hibridación y lavados</u>	74
11.3.1. <u>Prehibridación</u>	74
11.3.2. <u>Hibridación y lavados</u>	74
11.3.2.1. Hibridación con sondas radiactivas	75
11.3.2.2. Hibridación con sondas no radiactivas	75
11.3.2.3. Hibridación con sondas no radiactivas (<i>GeneChip</i>)	75
11.4. <u>Detección</u>	76
11.4.1. <u>Radiactiva</u>	76
11.4.2. <u>No radiactiva</u>	76
11.4.3. <u>No radiactiva (<i>GeneChip</i>)</u>	77
11.5. <u>Reutilización de membranas</u>	77
11.5.1. <u>Hibridación radiactiva</u>	77
11.5.2. <u>Hibridación no radiactiva</u>	77
12. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	78
12.1. <u>Obtención de proteínas intracelulares</u>	78
12.1.1. <u>Condiciones de cultivo</u>	78
12.1.2. <u>Concentración y diálisis de las muestras</u>	78
12.2. <u>Obtención de proteínas intracelulares de <i>A. thaliana</i></u>	79
12.3. <u>Obtención de proteínas extracelulares</u>	79
12.3.1. <u>Condiciones de cultivo</u>	79
12.3.2. <u>Concentración y diálisis de los sobrenadantes</u>	79
12.4. <u>Cuantificación de proteínas</u>	79
12.5. <u>Ensayos de actividad endopoligalacturonasa</u>	79
12.5.1. <u>En medio sólido</u>	79
12.5.2. <u>En medio líquido</u>	80
12.6. <u>Técnicas electroforéticas: Electroforesis unidimensional de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)</u>	81
12.5.1. <u>Determinación de la actividad endopoligalacturonasa en geles de acrilamida</u>	81
12.7. <u>Técnicas electroforéticas: Electroforesis bidimensional de proteínas en condiciones desnaturizantes (2D SDS-PAGE)</u>	82
12.7.1. <u>Primera dimensión (isoelectroenfoque, IEE)</u>	82
12.7.2. <u>Equilibrado de las tiras</u>	82
12.7.3. <u>Segunda dimensión</u>	82
12.7.4. <u>Tratamiento informático de las imágenes</u>	83

12.8. Tinción de proteínas en geles de acrilamida: Tinción con azul de Coomassie	83
12.9. Identificación de proteínas	84
12.9.1. <u>Espectrometría de masas</u>	84
12.9.2. <u>Identificación por huella peptídica</u>	84
13. ENSAYOS DE CRECIMIENTO Y GERMINACIÓN	84
13.1. Ensayos con <i>Trichoderma</i>	84
13.2. Ensayos con <i>A. thaliana</i>	85
14. DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS	85
15. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y SOFTWARE UTILIZADO	86
15.1. Búsqueda de secuencias similares en bases de datos	86
15.1.1. <u>FASTA</u>	86
15.1.2. <u>BLAST</u>	86
15.2. Alineamiento de secuencias	87
15.3. Otras manipulaciones de secuencias	87
15.4. Análisis estructural de proteínas	88
15.5. Análisis de los dominios de unión a factores de transcripción	88
15.6. Otras herramientas de predicción	88
15.7. Análisis filogenéticos	89
15.8. Análisis estadístico	89
15.8.1. <u>Datos obtenidos en <i>microarrays</i></u>	89
15.8.2. <u>Datos obtenidos en otros ensayos</u>	90
15.9. Herramientas de edición	90
16. CASAS COMERCIALES	90
Capítulo 1: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>Thpg1</i> DE <i>T. harzianum</i> T34	93
RESULTADOS	94
1. TRABAJO PREVIO	95
2. AISLAMIENTO DE <i>Thpg1</i> A PARTIR DE LA EST 10663	96
3. ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA	97
3.1. Identificación de intrones en la secuencia de <i>Thpg1</i>	97

3.2. Estudio de la secuencia del promotor de <i>Thpg1</i>	98
3.3. Análisis de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína ThPG1	100
4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	106
5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>Thpg1</i>	107
6. ANÁLISIS <i>SOUTHERN</i> DE <i>Thpg1</i> : PRESENCIA EN OTRAS CEPAS DE <i>Trichoderma</i>	109
7. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENDOPOLIGALACTURONASA EN LOS CULTIVOS DE <i>T. harzianum</i> T34	110
7.1. Ensayo en placa	111
7.2. Determinación de azúcares reductores (Somogyi-Nelson)	111
7.3. Determinación de la actividad endopoligalacturonasa en geles de acrilamida	112
8. SISTEMAS DE INTERACCIÓN <i>T. harzianum</i> -PLANTA-PATÓGENO	114
8.1. Análisis de la expresión de <i>Thpg1</i>	114
8.2. Análisis proteómico: ThPG1	115
DISCUSIÓN	117
Capítulo 2: SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>Thpg1</i> EN <i>T. harzianum</i> T34.	130
RESULTADOS	131
1. TRABAJO PREVIO	132
2. OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>T. harzianum</i> T34 QUE SILENCIAN EL GEN <i>Thpg1</i>	132
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS TRANSFORMADAS CON pJL43b1- <i>Thpg1</i>	132
3.1. Comprobación y selección de los transformantes	133
3.2. Confirmación de los transformantes: análisis tipo <i>Southern</i>	134
3.3. Análisis de la expresión de <i>Thpg1</i> en los transformantes seleccionados	135
3.4. Ensayos de crecimiento en placa	136
DISCUSIÓN	138

Capítulo 3: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA DE <i>Thpg1</i> MEDIANTE TECNOLOGÍA DE MICROARRAYS DE <i>A. thaliana</i>	143
RESULTADOS	144
1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	145
2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	146
3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	147
4. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE <i>Northern</i>	151
DISCUSIÓN	154
Capítulo 4: SOBREEXPRESIÓN DEL GEN <i>Thpg1</i> EN PLANTAS DE <i>A. thaliana</i>	160
RESULTADOS	161
1. OBTENCIÓN DE PLANTAS DE <i>A. thaliana</i> QUE EXPRESAN EL GEN <i>Thpg1</i>	162
1.1. Construcción del vector de expresión pBI121- <i>Thpg1</i>	162
1.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con pBI121- <i>Thpg1</i>	162
1.3. Infección de plantas de <i>A. thaliana</i> con las cepas transformadas de <i>Agrobacterium</i>	163
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS TRANSFORMADAS CON pJL43b1- <i>Thpg1</i>	164
2.1. Comprobación y selección de los transformantes	164
2.2. Confirmación de los transformantes: análisis tipo <i>Southern</i>	165
2.3. Análisis de la expresión de <i>Thpg1</i> en los transformantes seleccionados	165
2.4. Análisis de la actividad endopoligalacturonasa en los transformantes seleccionados	166
2.5. Ensayos de resistencia a estreses abióticos	167
2.6. Análisis morfológico (fenotípico)	168
2.7. Análisis de hormonas en las líneas seleccionadas	170
DISCUSIÓN	172

CONCLUSIONES	177
APÉNDICE	180
BIBLIOGRAFÍA	182

INTRODUCCIÓN

1. BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Trichoderma*

1.1. Morfología

Trichoderma agrupa hongos filamentosos anamórficos (mitóticos) que de forma artificial han venido clasificándose en la División Deuteromicota (Gams y col., 1987) y dentro de ésta, en la clase de los Hifomicetos. Se reproducen de forma asexual mediante un ciclo en el que se alternan micelio y esporas, también llamadas conidios. Estos conidios o esporas asexuales se forman a partir de células desnudas, sin la envoltura adicional de un cuerpo fructífero. En algunos aislamientos se ha descrito el estado perfecto o sexual, o teleomórfico (meiótico), dentro del género *Hypocrea* y géneros relacionados como *Podostroma*, *Sarawakus*, *Aphysiostroma* y *Protocrea* (Gams y Gräfenhan, 2006), representando *Trichoderma* un grupo de derivados clonales que ha perdido la capacidad de completar un ciclo sexual (Kuhls y col., 1996). Recientemente, se ha identificado a *Hypocrea lixii* como el estado teleomórfico de *Trichoderma harzianum*, una de las especies del género más citadas en el control biológico (Chaverri y col., 2003).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y emiten grandes cantidades de conidios verdes (Figura 1) 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. En determinadas condiciones nutricionales o frente a la desecación, se producen unas estructuras de resistencia denominadas clamidosporas. Éstas, se forman sobre el micelio, son globosas, con pared rugosa y más gruesa que la de los conidios, y tienen gran importancia en la supervivencia del hongo (Lewis y Papavizas, 1984). El número de cromosomas por núcleo y el tamaño del genoma varían según la especie, de 3 a 7 y de 30,5 a 38,8 Mb, respectivamente (Goldman y col., 1998; C. M. Kenerley, comunicación personal).

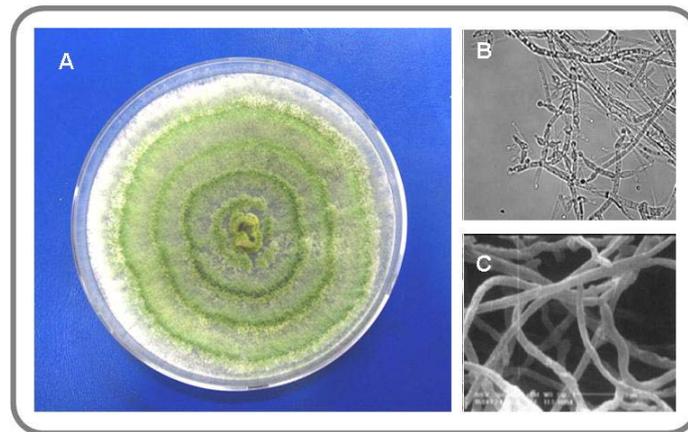


Figura 1. Aislamiento de *T. harzianum* CECT 2413 (A) e imágenes de la misma cepa captadas con un microscopio de contraste de fases (B) y electrónico de barrido (C), tomado de (Benítez y col., 2004).

1.2. Sistemática

El género *Trichoderma* se describió hace ya más de 200 años (Persoon, 1794) y desde entonces y hasta la aplicación de técnicas moleculares, la taxonomía del género se basó en criterios morfológicos, lo que llevó a una gran confusión e imprecisión a la hora de asignar nombres a los nuevos aislamientos dentro de los grupos establecidos. Entre las primeras clasificaciones, basadas en criterios morfológicos, se encuentran las de Rifai (1969) y Bissett (1991). Rifai estableció nueve "agregados específicos", en cada uno de los cuales encuadró especies fisiológicamente distintas pero con una morfología similar. Más tarde, Bissett revisó las especies de *Trichoderma* existentes, los "agregados específicos" y algunas formas anamórficas de *Hypocrea*, y propuso la división del género *Trichoderma* en cinco nuevas secciones: TRICHODERMA, PACHYBASIMUM, LONGIBRACHIATUM, SATURNISPORUM e HYPOCREARUM (formas anamórficas de *Hypocrea*) (Bissett, 1991).

Los primeros estudios orientados a caracterizar cepas de *Trichoderma*, no basados en criterios morfológicos, aplicaron características fisiológicas y/o bioquímicas (Zamir y Chet, 1985; Stasz y col., 1989; Grondona y col., 1997). Actualmente, el uso de técnicas moleculares como perfiles RFLP, perfiles RAPD-PCR, secuencias de distintas zonas del genoma o marcadores SCAR (Muthumeenakshi y col., 1994; Arisan-Atac y col., 1995; Hermosa y col., 2000, 2001; Rubio y col., 2005) se están imponiendo, tanto para la identificación de cepas como para la sistemática del género. Particularmente útiles resultan los datos de secuencias obtenidos de las regiones ITS y de genes como el que codifica el factor de elongación de la transcripción 1 (*tef1*), el ADNr 18S, el ADNr 28S o la endoquitinasa 42 (*ech42*), ya que han permitido desde establecer nuevos

taxones (Kullnig-Gradinger y col., 2000; Kubicek y col., 2003), describir nuevas especies como *Trichoderma asperellum* (Lieckfeldt y col., 1999) o *Trichoderma pleurotum* (Komon-Zelazowska y col., 2007), relacionar especies como *T. harzianum* con su fase sexual *H. lixii* (Chaverri y col., 2003), hasta distinguir y tipificar aquellas formas que son dañinas para los cultivos de champiñón (Hermosa y col., 1999, 2000).

En la actualidad, se aceptan cuatro secciones dentro del género *Trichoderma*: PACHYBASIUM (*T. harzianum* y *T. virens*), TRICHODERMA (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride*), LONGIBRACHIATUM (*T. longibrachiatum* y *T. saturnisporum*) e HYPOCREARUM (estados anamórficos de *Hypocrea*) (Samuels, 1996; Hermosa y col., 2004). Las especies de las dos primeras secciones constituyen las principales especies utilizadas en control biológico. No obstante, el número de especies contenido en cada una de las secciones depende de los continuos cambios que sufre su sistemática

1.3. Ecología

El género *Trichoderma* comprende un grupo de hongos de rápido crecimiento que son habituales de suelos forestales y agrícolas. *Trichoderma* se adapta a todo tipo de climas pero aparece de forma abundante sobre restos vegetales de zonas húmedas (Klein y Eveleigh, 1998). Los sustratos que *Trichoderma* puede utilizar en su crecimiento son muy variados aunque muestra preferencia por los suelos ácidos y ricos en materia orgánica (Hubbard y col., 1983; Klein y Eveleigh, 1998). En cuanto a los parámetros ambientales necesarios para su crecimiento, *Trichoderma* puede crecer dentro de un amplio rango de temperaturas. Otro aspecto a destacar, es la resistencia relativa de varias especies de *Trichoderma* a numerosos fungicidas químicos utilizados en agricultura como son los pesticidas organoclorados de tipo endosulfano (Katayama y Matsumura, 1993; Shaban y El-Komy, 2001) o los bencimidazoles (Mukherjee y col., 2003). Este hecho, junto con su velocidad de crecimiento y su fácil adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas (López-Errasquin y Vázquez, 2003), daría a *Trichoderma* ventaja sobre otros muchos hongos filamentosos en la colonización de suelos después de la aplicación de estos tratamientos.

2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Hace más de 70 años que Weindling (1932) describió la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* (ahora *T. viride*). Desde entonces se han observado diferentes mecanismos por los cuales *Trichoderma* previene y protege a las plantas contra el ataque de otros hongos. Actualmente, los mecanismos de acción de *Trichoderma* descritos son cinco (Hjeljord y Tronsmo, 1998; Howell, 2003; Harman y col., 2004): (i) micoparasitismo, (ii) antibiosis, (iii) competencia, (iv) promoción del crecimiento y/o (v) inducción de resistencia en la planta hospedadora. Estos mecanismos no son excluyentes entre sí, y la importancia relativa de cada uno de ellos aún no está bien establecida, aunque parece que depende de la cepa de *Trichoderma*, del patógeno diana y de las condiciones edáficas y ambientales.

2.1. Micoparasitismo

Se define el micoparasitismo como la relación que un organismo establece con un hongo huésped de manera que se beneficia del mismo, normalmente obteniendo nutrientes sin aportarle nada a cambio y, en ocasiones, causando su muerte. Cuando ocurre esto último se habla de micoparásitos necrotróficos para diferenciarlos de los biotróficos, que mantienen su relación con células vivas durante largos periodos de tiempo.

Los eventos que conllevan al micoparasitismo son complejos y tienen lugar de una manera ordenada (Figura 2). En primer lugar, *Trichoderma* localiza al patógeno y comienza a crecer por tropismo hacia él (Chet y col., 1981; Lu y col., 2004). Esta detección a distancia se debe, al menos parcialmente, a la expresión secuencial de enzimas que degradan la pared celular de los hongos (CWDEs). Aunque las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden seguir distintos patrones de inducción de CWDEs, parece seguro que una exoquitinasa extracelular, que se produce de forma constitutiva en pequeñas cantidades, podría estar implicada en este proceso. Esta exoquitinasa provoca la liberación de algunos oligómeros de la pared del hongo diana. Estos compuestos son los que inducen la expresión de endoquitinasas tóxicas (Brunner y col., 2003; Harman, 2006) que, al ser liberadas por *Trichoderma*, difunden y comienzan el ataque al hongo diana antes de que se haya producido el contacto físico (Zeilinger y col., 1999; Viterbo y col., 2002b).

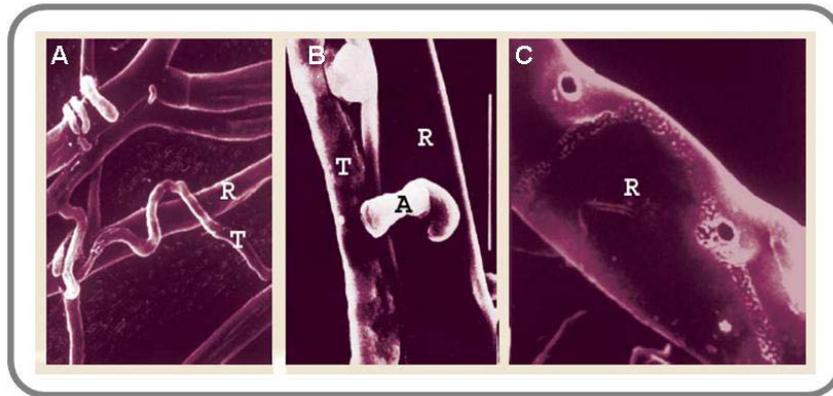


Figura 2. *Trichoderma* parasitando al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. **(A)** Hifa de *Trichoderma* (T) parasitando una hifa de *R. solani* (R), se observa una reacción típica de enrollamiento. **(B)** Fotografía ampliada de la interacción *Trichoderma-Rhizoctonia* donde pueden observarse las estructuras de tipo apresorio (A). La barra equivale a 10 μm . **(C)** Hifa de *R. solani* de la que se ha retirado la hifa de *Trichoderma*. Pueden observarse los poros provocados por el micoparásito en algunos puntos de unión entre ambas hifas. Tomado de (Harman y col., 2004).

Una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* puede enroscarse alrededor del hongo diana y formar estructuras especializadas de tipo apresorio, con las que podrá penetrar posteriormente en el interior de las hifas del patógeno. La unión parece estar mediada por la interacción entre carbohidratos de la pared celular de *Trichoderma* y lectinas del hongo diana (Inbar y Chet, 1996; Rocha-Ramírez y col., 2002). Una vez en contacto, *Trichoderma* produce varias CWDEs y antibióticos, como los peptaiboles (Schirmböck y col., 1994; Degenkolb y col., 2003), que generarían agujeros en la pared celular.

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). En algunos casos, también se observa la esporulación de *Trichoderma* tras la completa digestión del hongo atacado (Elad y col., 1984).

El mecanismo micoparasítico de *Trichoderma* implica la acción de diversas CWDEs (Elad y col., 1982; Papavizas, 1985; Chet y col., 1998; Sanz y col., 2004), entre las cuales se encuentran quitinasas, β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas y proteasas. Debido a que la quitina y el β -1,3-glucano son los principales componentes estructurales de las paredes celulares de hongos [los oomicetos, con pared de celulosa (Bartnicki-García, 1968), han dejado de ser considerados hongos para pasar a ser cromistas], se ha propuesto que las quitinasas y las β -1,3-glucanasas son las enzimas

claves en este proceso (Elad y col., 1982; Papavizas, 1985; de la Cruz y col., 1993). Sin embargo, se ha visto que otras enzimas que hidrolizan otros componentes minoritarios de las paredes fúngicas (proteínas, β -1,6-glucanos, α -1,3-glucanos) también están implicadas en el proceso (Viterbo y col., 2002a; Sanz y col., 2005; Suárez y col., 2005).

2.1.1. Quitinasas

La quitina, homopolímero de N-acetil- β -D-glucosamina (NAG) con uniones β -1,4 es, tras la celulosa, uno de los polímeros más abundante en la naturaleza (Li, 2006). Las quitinasas, enzimas que degradan quitina, se clasifican habitualmente dentro de las familias 18, 19 y 20 de las glicosil hidrolasas, según la similitud de sus secuencias aminoacídicas (Dahiya y col., 2006).

En función de los productos de reacción que generan en la degradación de la quitina, las quitinasas se clasifican (Sahai y Manocha, 1993) en: (i) endoquitinasas (EC 3.2.1.14), que cortan aleatoriamente el polímero de quitina dando lugar a una mezcla de oligómeros de distinto tamaño y bajo peso molecular, principalmente (NAG)₂, (ii) exoquitinasas o quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), que liberan dímeros de NAG a partir del extremo no reductor de la quitina y (iii) 1,4- β -N-acetil glucosaminidasas (EC 3.2.1.30), también denominadas hexosaminidasas (EC 3.2.1.52) o quitobiasas, cuyo modo de acción es de tipo exo y cortan el oligómero de quitina dando lugar a monómeros de NAG. Muchas de estas enzimas se han purificado y se han clonado muchos de los genes que las codifican (Kubicek y col., 2001; Limón y Benítez, 2002).

Se han encontrado quitinasas en muchas especies de *Trichoderma*, e incluso explorado su presencia potencial en los genomas de *Trichoderma* ya secuenciados (Seidl y col., 2005), pero es en *T. harzianum* donde el sistema quitinolítico se ha estudiado más detalladamente. Se han clonado, en diferentes cepas, los genes que codifican algunas quitinasas como CHIT37, CHIT42 y CHIT33 de *T. harzianum* (García y col., 1994; Limón y col., 1995; Viterbo y col., 2001) y CHIT36 de *T. asperellum* (Viterbo y col., 2002a).

Inicialmente, el efecto antifúngico de la 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). También, se ha observado un sinergismo en el efecto antifúngico frente a *Botrytis cinerea*, cuando se combinaron quitinasas, con distintos mecanismos de acción y procedentes de diferentes cepas de *Trichoderma*, con otras quitinasas obtenidas de diversos hongos, plantas y bacterias (Lorito y col., 1996b). Incluso, las quitinasas de *Trichoderma* se han llegado a describir como unas herramientas moleculares que

permiten aumentar la capacidad de biocontrol tanto de cepas de *Trichoderma* como de otros microorganismos o plantas frente a enfermedades fúngicas (Woo y col., 2001). Un estudio reciente demuestra que la sobreexpresión en *T. atroviride*, del gen *ThEn-42*, que codifica una endoquitinasa de *T. harzianum*, aumenta su capacidad de biocontrol frente al patógeno *Penicillium digitatum* (Deng y col., 2007). A su vez, plantas transgénicas de limonero, transformadas con este mismo gen, muestran mayor tolerancia al patógeno foliar *B. cinerea* y, también, muestran mayores niveles de expresión de otros genes relacionados con defensa (Distefano y col., 2008). De manera similar, la sobreexpresión de dos endoquitinasas de *T. harzianum*, *chit33* y *chit42*, en plantas de tabaco, determinó una mayor resistencia de estas líneas transgénicas a diferentes estreses bióticos y abióticos (Dana y col., 2006).

Durante el proceso de micoparasitismo se ha observado una transcripción secuencial de los genes que codifican quitinasas, de forma que a veces la pérdida de expresión de uno de estos genes conlleva una desregulación del sistema quitinolítico (Inbar y Chet, 1995; Zeilinger y col., 1999; Brunner y col., 2003).

2.1.2. Glucanasas

Las glucanasas agrupan un gran número de enzimas que degradan homopolímeros lineales o ramificados de D-glucosa unidos mediante enlaces α y/o β . Estas enzimas están involucradas en diversas funciones morfogénicas, llevando a cabo procesos de diferenciación o nutricionales, para la obtención de energía a partir de polímeros de reserva. En *Trichoderma* se les ha atribuido un papel importante en el micoparasitismo aunque el sistema ha sido menos estudiado que para las quitinasas (Benhamou y Chet, 1993; Lorito y col., 1996a).

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 β -1,4-glucanasas o celulasas, β -1,3-glucanasas y β -1,6-glucanasas, aunque también se han descrito otras como las α -1,3-glucanasas.

Las celulasas rompen los enlaces β -1,4 de la celulosa, un polímero de D-glucosa. Las celulasas se clasifican en un amplio número de familias dentro las glicosil hidrolasas, en función de la similitud de secuencias o de sus dominios catalíticos (Bayer y col., 1998). A su vez, en función de los productos de reacción que generan, se clasifican en: (i) β -1,4-D-glucancelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), que liberan dímeros de D-glucosa del extremo no reductor de la celulosa, (ii) endo- β -1,4-D-glucanasas (EC 3.2.1.4), que digieren aleatoriamente la celulosa y (iii) β -1,4-glucosidasas (EC 3.2.1.21), que liberan monómeros de D-glucosa. En *T. reesei* se han identificado al menos tres formas diferentes de endoglucanasas (EGI, EGII y EGIII), dos glucancelobiohidrolasas (CBHI y CBHII) y distintas β -glucosidasas, que actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa (Hui y col., 2001).

Las β -1,3-glucanasas degradan β -1,3-glucanos tanto lineales como ramificados, y tanto en modo exo (EC 3.2.1.58) como endo (EC 3.2.1.39). Se han identificado numerosas β -1,3-glucanasas dentro del género *Trichoderma* (Vazquez-Garcidueñas y col., 1998) que han demostrado, *in vitro*, inhibir el crecimiento o la germinación de distintos hongos (Lorito y col., 1994a; El-Katatny y col., 2001).

Las β -1,6-glucanasas degradan polímeros de glucosa unidos mediante enlaces β -1,6, tanto en su modo endo (EC 3.2.1.75) como exo (EC 3.2.1.21). Se han purificado varias endo- β -1,6-glucanasas de la cepa *T. harzianum* T34 (de la Cruz y col., 1992; de la Cruz y Llobell, 1999; Montero y col., 2005) y clonado los genes relativos: *bgn16.2* (Lora y col., 1995; Delgado-Jarana, 2001), *bgn16.1* y *bgn16.3* (Montero y col., 2007). Estos trabajos las han relacionado directamente con el micoparasitismo, ya que transformantes que sobreexpresan alguno de estos genes tienen mayor actividad antifúngica frente a hongos patógenos, como *R. solani* o *B. cinerea*, respecto a la cepa silvestre.

También, las α -1,3-glucanasas o mutanasas se han relacionado con la actividad antagonista de *Trichoderma* frente a distintos hongos fitopatógenos (Ait-Lahsen y col., 2001; Sanz y col., 2004).

2.1.3. Proteasas

Las funciones de las proteasas son muchas y de diversa naturaleza. Participan en procesos de 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, en invernadero (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). En esa misma cepa, se han aislado dos aspartil proteasas ácidas y se ha comprobado que la expresión de los genes correspondientes es inducible por quitina (Delgado-Jarana y col., 2002) y por paredes celulares de hongos fitopatógenos (Suárez y col., 2005), aunque no se ha demostrado su papel directo en el micoparasitismo. Recientemente, mediante una aproximación genómica, se han descrito 11 nuevas peptidasas de *T. harzianum* T34 cuya relación con la capacidad de biocontrol se ha analizado por medio del estudio de la expresión de sus respectivos genes en condiciones de micoparasitismo simulado (Suárez y col., 2007).

2.2. Antibiosis

La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por el producto metabólico de otro, sin que medie contacto físico entre ellos. Muchas cepas de *Trichoderma* liberan metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles, que producen este efecto (Figura 3). La actividad antibiótica de *Trichoderma* fue detectada por primera vez por Weindling (1932) y desde entonces se han descrito numerosos antibióticos producidos por las especies de este género.

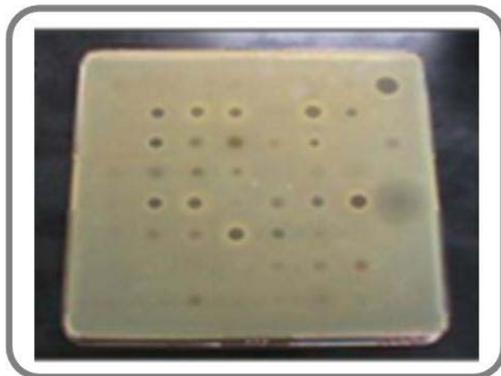


Figura 3. Imagen del resultado de un ensayo de antibiosis donde se muestran los halos de inhibición del crecimiento de colonias bacterianas producidos por filtrados extracelulares de *Trichoderma*.

Los metabolitos secundarios se dividen, en función de su ruta biosintética, en los siguientes grupos (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998): derivados de los ácidos tricarbónicos, no derivados de acetatos, ácidos grasos, compuestos heterocíclicos de oxígeno, poliquétidos, terpenos y derivados, derivados de aminoácidos y pironas. La producción de estos antibióticos es dependiente de cada aislado y de las condiciones ambientales, que determinan qué compuestos se sintetizarán y en qué cantidad. Una revisión de los metabolitos de *Trichoderma* y su importancia en procesos de biocontrol se recoge en Cardoza y col. (2005).

El papel de estos compuestos en el antagonismo es fundamental, ya que mutantes de *T. virens* deficientes en la producción de gliotoxina pierden totalmente la capacidad de inhibir a *R. solani* (Howell y Stipanovic, 1995). Los mecanismos de antagonismo que *Trichoderma* utiliza no son independientes, sino que interactúan unos con otros. Un ejemplo de este sinergismo se ha observado sobre el efecto antifúngico frente a varios géneros de hongos fitopatógenos como *Botrytis*, *Fusarium* o *Alternaria*, que se incrementa, tras una aplicación conjunta de antibióticos y CWDEs de *Trichoderma* (Lorito y col., 1996b).

2.3. Competencia con el patógeno

La competencia es un aspecto importante del control biológico y ocurre cuando dos o más microorganismos requieren de un mismo recurso más de lo que está disponible de forma inmediata. 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. Aparece en casi todos los suelos y también en hábitats naturales que contienen grandes cantidades de materia orgánica, donde se comporta como un excelente descomponedor de material vegetal y fúngico. Además, muchas especies del género *Trichoderma* muestran una gran versatilidad metabólica que les permite crecer utilizando un amplio abanico de fuentes de nitrógeno y carbono (Grondona y col., 1997). Por otra parte, la capacidad para colonizar la rizosfera de las plantas es un punto clave en este proceso ya que un agente de control biológico que no sea capaz de crecer en la rizosfera no podrá competir por el espacio y los nutrientes de ese ecosistema (Howell, 2003).

Por ejemplo, la competición por el espacio es el mecanismo que asegura la protección de los racimos de uvas contra la “podredumbre gris” causada por *B. cinerea*, ya que este patógeno no puede instalarse sobre los capuchones florales de vides que han sido colonizados por *T. harzianum* (Dubos y col., 1982). En la bibliografía se pueden encontrar otros casos en los que se alude a la competencia por los nutrientes como responsable directa del efecto antagonista de *Trichoderma* (Howell y Stipanovic, 1995; Handelsman y Stabb, 1996; Lo y col., 1996). En la Figura 4 se muestra un cultivo dual de *Trichoderma* (izquierda) y el hongo patógeno *Colletotrichum acutatum*.



Figura 4. Imagen de un enfrentamiento dual de *Trichoderma* (izquierda) y el hongo patógeno *C. acutatum* (derecha).

A pesar de todo, es difícil determinar si solamente mediante la competencia *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista o si, por el contrario, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competencia se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman, 2000). Es mucho lo que falta por aprender sobre el orden secuencial de estos eventos.

2.4. Promoción del crecimiento de las plantas

En los últimos años se ha comprobado la capacidad de ciertas cepas *Trichoderma* para estimular el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas (Figura 5), lo que se traduce en un incremento de la productividad (Harman y col., 2004). Plantas de pepino inoculadas con la cepa de biocontrol *T. harzianum* T-203, mostraron un incremento del 75-95% en el sistema radical, y un aumento de la superficie foliar del 80% (Yedidia y col., 2001). Para explicar este hecho se han sugerido varios mecanismos como son la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores o la conversión de material no utilizable en formas que puedan ser asimiladas por las plantas. Por ejemplo, *Trichoderma* posee la capacidad de solubilizar metales como el zinc, el manganeso, el hierro o el cobre, convirtiéndolos en nutrientes asimilables por las plantas (Altomare y col., 1999).

Otras propiedades identificadas en *Trichoderma* a lo largo del proceso de interacción con la planta, son la resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico y cambios en el estado nutricional (Howell, 2003). Estudios recientes demuestran que algunas cepas de *Trichoderma* pueden regular los niveles de auxina en la rizosfera y estimular el crecimiento de las plantas y, por extensión, proteger el sistema radical e inducir la defensa sistémica frente al ataque de patógenos (Björkman, 2004).



Figura 5. Imagen de una planta de pepino tratada con *T. harzianum* T22 (+T22) y no tratada (-T22).

2.5. Inducción de mecanismos de resistencia en planta

La capacidad de distintas cepas de *Trichoderma* para proteger a las plantas frente a patógenos de raíz, se atribuyó durante mucho tiempo a un efecto directo contra el patógeno (Chet y col., 1998). Sin embargo, se ha comprobado que la asociación directa de *Trichoderma* con las raíces de la planta, estimula los mecanismos de defensa de la misma (Yedidia y col., 1999), lo que conlleva una resistencia contra un variado

tipo de microorganismos fitopatógenos e incluso nematodos (Harman y col., 2004). Esta resistencia inducida no es específica de un determinado tipo de planta y puede ser localizada o sistémica, capacitándola para ejercer una respuesta mayor y más rápida ante el ataque de patógenos (Conrath y col., 2002). Esta respuesta incluye la secreción de peroxidases, la síntesis de fitoalexinas, la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis o “PR”, la biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell, 2006) o el aumento de los niveles de ácido salicílico (Meyer y col., 1998) y ácido jasmónico (Segarra y col., 2007). Un estudio reciente realizado por Navazio y col. (2007) determina la importancia de los cambios en la concentración del calcio citosólico en la planta, para la detección de *Trichoderma*.

La capacidad colonizadora de *Trichoderma* se realiza a través de la germinación y colonización de la superficie de las raíces, y la posterior penetración en las primeras capas de células de la epidermis (Yedidia y col., 1999; Zeilinger y col., 1999; Harman y col., 2004; Woo y col., 2006). En esta etapa de la interacción *Trichoderma*-planta muchos genes como los que codifican hidrofobinas, necesarias posiblemente para la adherencia a las raíces, se activan de forma específica (Benítez y col., 2004; Rosado y col., 2007). Este contacto da como resultado la activación de los mecanismos de defensa de la planta. *Trichoderma* permanece en ella como un microorganismo avirulento y simbiote, que estimula su crecimiento (y con ello aumentan los exudados de la raíz que son nutrientes para *Trichoderma*) y la protege de los patógenos directamente y a través de una respuesta inducida (Harman y col., 2004; Woo y col., 2006). Por medio de estudios transcriptómicos se ha podido comprobar que algunas cepas de *Trichoderma* inducen de forma activa cambios sistémicos en la fisiología y la resistencia de la planta a los patógenos, modulando la expresión de genes relacionados con el estrés y el metabolismo de la misma (Alfano y col., 2007).

En los últimos años se está analizando el papel que juega *Trichoderma* en su relación con la planta y el patógeno, desde el punto de vista de la producción de moléculas que podrían actuar como elicitores de la respuesta de defensa en plantas (Woo y col., 2006; Vinale y col., 2008). Se han establecido, al menos, tres vías de elicitación de esta respuesta: mediante enzimas o péptidos, por proteínas avr, o bien, mediante oligosacáridos de bajo peso molecular liberados por la acción de enzimas específicas de *Trichoderma* sobre la pared celular del patógeno y/o la planta. Recientemente, se han aislado genes del tipo avr, similares a los que poseen los patógenos avirulentos, o del tipo de transportadores ABC, relacionados con la resistencia de *Trichoderma* a moléculas tóxicas que secretan las plantas o los hongos fitopatógenos (Harman y col., 2004; Woo y col., 2006). En la actualidad, las investigaciones se están centrando en determinar la función de las enzimas que degradan la pared celular de las plantas aunque la redundancia, en el genoma de *Trichoderma*, de este tipo de genes supone una dificultad añadida (Woo y col., 2006). Algunas de estas moléculas parecen ser enzimas del tipo xilanasas cuya acción debe inducir la biosíntesis de fitoalexinas y de peroxidases por parte de la planta (Harman y

col., 2004). Celulasas activas o inactivadas por calor, son capaces de estimular la ruta del ácido salicílico o la del etileno, respectivamente (Martínez y col., 2001). Así, las enzimas secretadas por *Trichoderma* son usadas como una herramienta para inducir una respuesta ISR en la planta.

3. APLICACIONES DEL GÉNERO *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* poseen características que las convierten en organismos con un gran interés industrial. La habilidad de *T. reesei* para producir enzimas celulolíticas capaces de degradar el material celulósico ha dirigido su explotación comercial hacia áreas tan diversas como las fermentaciones alcohólicas, los detergentes para el lavado de ropa, el blanqueo del papel reciclado, la alimentación animal o la producción de combustibles (Reese y Mandels, 1989; Kubicek y col., 1990). Por otro lado, la capacidad de *Trichoderma* para secretar proteínas lo presenta como una alternativa a los organismos empleados hoy en día como “fábricas celulares” para la producción de proteínas con fines farmacéuticos (Rey y col., 2004).

Del mismo modo, las quitinasas de *Trichoderma* se emplean en la degradación de los restos de quitina de diversas industrias, como las que trabajan con crustáceos, para obtener N-acetil-glucosamina, que se emplea como suplemento alimenticio, (Cosio y col., 1982).

En la industria del vino se ha encontrado una posible aplicación para las β -1,3-glucanasas en la clarificación de caldos (Dubordieu y col., 1985), proceso que se ve favorecido por la degradación de polímeros que pueden aparecer en los mostos, como el cinerean, cuyo principal componente es el β -1,3-glucano. También se están utilizando metiltransferasas producidas por *Trichoderma* para mejorar las características organolépticas del vino (Coque y col., 2003).

Algunas especies de *Trichoderma* se usan en biorremediación. La cepa F6 de *T. atroviride* aplicada a suelos con plantas de *Brassica juncea*, detoxifica metales pesados como cadmio, níquel o una combinación de ambos (Cao y col., 2008).

Una de las aplicaciones que más interés despierta es la utilización de diferentes especies de *Trichoderma* como agentes de control biológico en agricultura para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos (Monte, 2001; Benítez y col., 2004; Harman y col., 2004). El control biológico se puede definir como el empleo de organismos distintos al hombre con capacidad para reducir la población del agente causante de una enfermedad o evitar sus efectos (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Estos organismos pueden ser patógenos hipovirulentos que compiten por el espacio y por los nutrientes, variedades de plantas más resistentes a la enfermedad, o microorganismos

antagonistas que interfieren con la supervivencia del patógeno o con sus mecanismos para provocar la enfermedad, como es el caso de *Trichoderma*.

Trichoderma se ha empleado como modelo de estudio en la mayor parte de las investigaciones realizadas sobre el control de enfermedades de origen fúngico, ya que se trata de un organismo ubicuo, fácil de aislar y cultivar. Numerosas especies clasificadas dentro de este género se han utilizado en experimentos de control biológico de hongos patógenos de plantas o en experimentos de control integrado que, en la mayoría de los casos, se basa en la combinación de agentes biológicos y químicos, reduciendo la dosis de estos últimos hasta niveles subletales, gracias al efecto sinérgico de la acción de ambos tipos de tratamientos (Chet e Inbar, 1994; Monte, 2001). Tampoco debe obviarse, el potencial de los genes y productos génicos de *Trichoderma* para el desarrollo de estrategias de biocontrol (Lorito y col., 1994b).

T. harzianum, *T. viride* y *T. virens* son las especies de *Trichoderma* más citadas en control biológico (Papavizas, 1985; Chet, 1987). Actualmente, *T. harzianum*, sola o en combinación con otras especies de *Trichoderma*, está siendo utilizada en preparaciones comerciales para el control de numerosas enfermedades de plantas producidas por hongos. Estas formulaciones se aplican directamente al suelo, a las semillas (“coating”) o, mediante diferentes sistemas de riego, a plántulas para trasplante en semilleros y en cultivos definitivos (Cook, 1997; Grondona y col., 2001).

4. SISTEMA PECTINOLÍTICO DE HONGOS

Son numerosos los estudios realizados en el género *Trichoderma* sobre CWDEs y su relación con el micoparasitismo, como es el caso de las enzimas del sistema quitinolítico, celulolítico o proteolítico (Viterbo y col., 2002b). Hasta la fecha, no existen estudios del sistema pectinolítico de este hongo y su implicación en la degradación de la pared celular de las plantas. En la mayoría de hongos fitopatógenos, se ha relacionado su sistema pectinolítico con procesos de patogénesis.

Tanto los hongos saprofiticos como los fitopatógenos producen una batería de enzimas extracelulares capaces de degradar los distintos componentes de la pared celular de las plantas. Estos hongos digieren la pared, no sólo para obtener una fuente de carbono, sino para penetrar el tejido vegetal en el proceso de infección (Annis y Goodwin, 1997).

Desde el punto de vista de los hongos fitopatógenos, se considera las endopoligalacturonasas (endoPGs) como importantes factores de virulencia (D’Ovidio y col., 2004a). Esto es debido a que dentro de la amplia batería de enzimas pectinolíticas que poseen estos hongos, las endoPGs son las enzimas que se producen en primer lugar

(D'Ovidio y col., 2004a). Estudios realizados sobre pectinasas de *B. cinerea* indican que las endoPGs son las primeras CWDEs detectadas en el proceso de infección (ten Have y col., 2001). Si tenemos en cuenta este hecho, es lógico que dentro del gran número de estudios realizados sobre enzimas pectinolíticas, la mayoría se centren en el estudio de las endoPGs.

Pero las endoPGs no actúan sólo como factores de virulencia, también se ha descrito el importante papel que desempeñan en la producción de moléculas elicitoras como los oligogalacturonidos (OGAs), que además de suponer una fuente de carbono para el hongo, desencadenan una respuesta de defensa en la planta (Ridley y col., 2001).

De manera general, las pectinasas se utilizan como enzimas líticas en las industrias alimentaria, para la clarificación de zumos o producción de purés, y del vino (Lang y Dörnenburg, 2000; Kashyap y col., 2001). También se aplican distintas formulaciones a base de pectinasas de *Aspergillus*, entre otras enzimas, en el proceso de maceración de la aceituna (Galante y col., 1993). Se ha descrito que la utilización de pectinasas en la separación de la corteza de la madera disminuye el consumo de energía necesaria para realizar este proceso (de Vries y Visser., 2001).

Son numerosas las referencias que se pueden encontrar acerca de las pectinasas, sobre todo en el género *Aspergillus*, por su potencial en la industria alimentaria. Se han descrito ramnogalacturonasas en *Aspergillus aculeatus* (Suykerbuyk y col., 1995), pectin liasas en *Aspergillus niger* (Harmsen y col., 1990), pectato liasas principalmente en bacterias (Herron y col., 2000) o pectin metilesterasas en *A. niger* (Khanh y col., 1991). Sin embargo, los trabajos sobre pectinasas en *Trichoderma* son muy escasos. La primera referencia describe la actividad pectinolítica en dos cepas de este hongo (Calistru y col., 1997); y, más recientemente, dos trabajos recogen la purificación de dos endoPGs en *T. reesei* (Mohamed y col., 2003) y otras dos en *T. harzianum* (Mohamed y col., 2006).

4.1. Estructura de la pectina

La pared celular de las plantas es una estructura perfectamente organizada, cuya composición molecular (polisacáridos, proteínas y sustancias aromáticas) varía entre las distintas especies, a nivel de los diferentes tejidos e incluso entre distintas partes de una misma célula. La complejidad que presenta esta estructura sugiere que la pared celular posee múltiples funciones. Actualmente, los estudios sobre pared celular están encaminados al análisis de su función, no desde un punto de vista estructural en la célula sino en relación a su capacidad para desencadenar respuestas defensivas en la planta a través de moléculas elicitoras (Vorwerk y col., 2004).

Los polisacáridos son los principales componentes de la pared celular vegetal constituyendo una compleja matriz formada por celulosa, hemicelulosas y pectina (Figura 6).

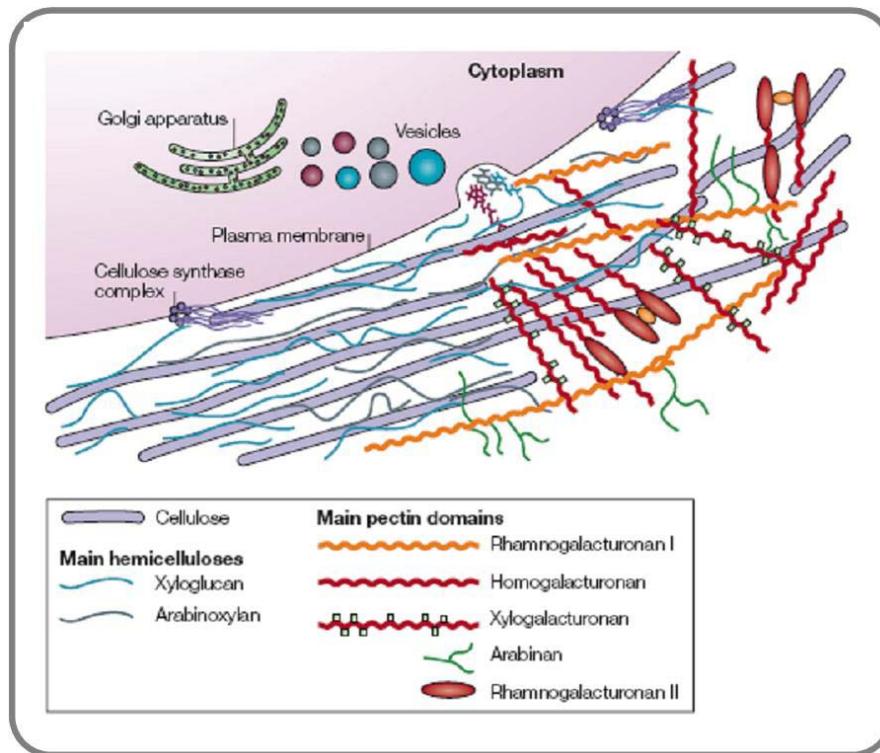


Figura 6. Representación esquemática de la pared celular vegetal, tomado de (Cosgrove y col., 2005).

La celulosa es el polisacárido más abundante y representa entre el 15% y el 30% del peso seco de la pared celular vegetal, siendo más abundante en la pared celular secundaria. Se encuentra formando microfibrillas, dispuestas paralelamente, constituidas por cadenas de β -1,4-glucano.

Las microfibrillas de celulosa se encuentran ligadas por carbohidratos no fibrilares que se denominan genéricamente hemicelulosas. Hay dos tipos de carbohidratos que están en todas las angiospermas, los xiloglicanos (XiGs) y los glucuronoarabinosilanos (GAXs). Otros polisacáridos no celulósicos, menos abundantes, son glucomananos, galactoglucomananos y galactomananos.

La pectina es el componente más importante de la pared celular. Se localiza principalmente en la pared primaria, aunque también se encuentra en la lámina media desarrollando un importante papel de adherencia entre las células (Willats y col., 2001). La pectina está constituida por un grupo de polisacáridos, complejo y heterogéneo, ricos en ácido galacturónico, formando una matriz en la que se disponen el resto de componentes de la pared celular. Estos polisacáridos se encuentran formando tres

dominios principales: ramnogalacturonano-I (RG-I), ramnogalacturonano-II (RG-II) y homogalacturonano (HGA), que se unen de manera covalente y con enlaces con cationes divalentes, como el calcio y el boro (Cosgrove y col., 2005) (Figura 7).

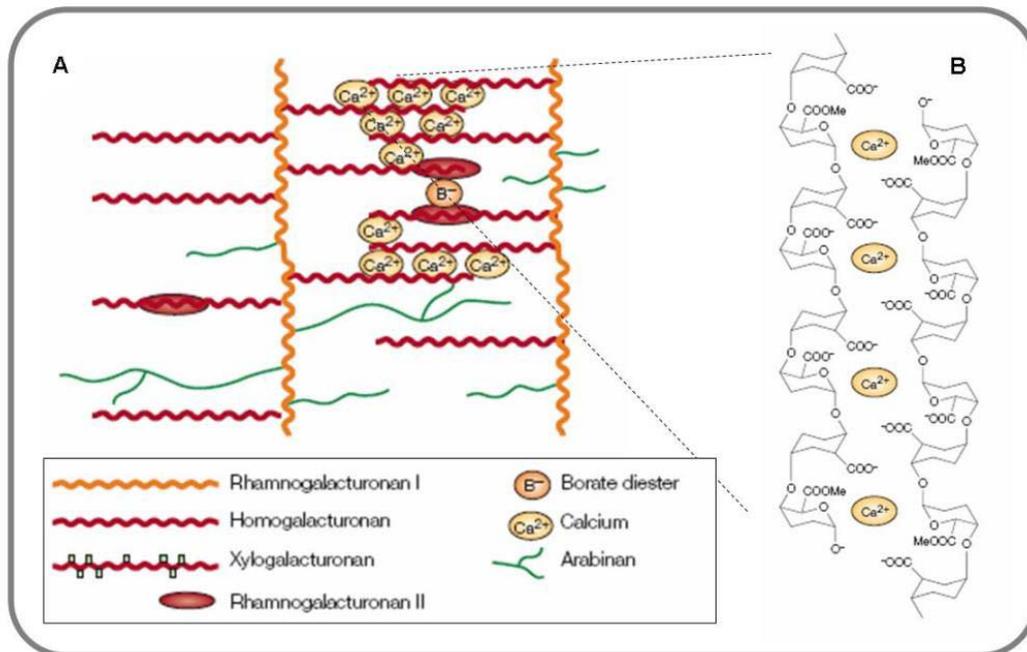


Figura 7. Representación esquemática de la estructura de la pectina (A). En la figura (B) se muestra detallada la disposición del dominio de homogalacturonano (HGA) formando las denominadas “cajas de huevo”, tomado de (Cosgrove y col., 2005).

→ Ramnogalacturonano-I: es un dominio formado por repeticiones de α -1,2-L-ramnosa y ácido α -1,4-D-galacturónico. El análisis de su estructura ha desvelado que sólo un 2% de los residuos de ácido galacturónico presentan cadenas laterales unidas al C-3, mientras que entre un 20 y un 80% de los residuos de ramnosa están sustituidos en el C-4 por complejas cadenas de polisacáridos (Ridley y col., 2001).

→ Ramnogalacturonano-II: es un dominio formado principalmente por residuos de ácido α -1,4-D-galacturónico sustituido en los carbonos C-2 y C-3 por complejas cadenas de polisacáridos y, en menor medida, por residuos de ramnosa (Ridley y col., 2001). Hay estudios que demuestran que este dominio se encuentra formando dímeros a través de enlaces diéster con el borato (Ishii y col., 2001) (Figura 7A) y que la presencia de boro contribuye al grado de porosidad de la matriz péctica (Willats y col., 2001).

→ Homogalacturonano: es un dominio formado por cadenas de entre 100 y 200 residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces α -1,4. Alrededor del 75% de estos residuos presentan esterificaciones en los grupos carboxilo (COO^-) con metanol (Cosgrove y col., 2005) aunque, dependiendo del tipo de planta, también puede

presentar esterificaciones con ácido acético en los carbonos C-2 y C-3 (Ridley y col., 2001). La disposición espacial más favorable, en términos de mínima energía, que puede adoptar el HGA es la helicoidal, no obstante, la unión de dos cadenas de HGA no esterificadas crea estructuras denominadas “cajas de huevo” (Figura 7B), donde la carga negativa de los grupos carboxilo permite la unión de iones calcio. Estas uniones hacen que se formen geles, estructuras importantes para el mantenimiento y la integridad de la pared celular (Willats y col., 2001).

La degradación microbiana de la pared celular es un proceso complejo que implica la participación de un gran número de enzimas que son producidas de manera secuencial, siendo las pectinasas las primeras en actuar para debilitarla y permitir el acceso a la hemicelulosa y la celulosa al resto de CWDEs (Annis y Goodwin, 1997).

4.2. Clasificación de las pectinasas

La pectina puede adoptar distintas conformaciones, por lo que se aceptan diversos nombres a la hora de describirla (Kashyap y col., 2001). Se denomina protopectina a la pectina insoluble tal y como se encuentra en los tejidos vegetales. Ácido péctico o pectato es el término que se aplica a la pectina que esta principalmente formada por cadenas de ácido galacturónico no esterificado. Por otro lado, las cadenas de ácido galacturónico que presentan un elevado grado de esterificación por grupos metilo reciben el nombre de ácido pectínico o de manera más genérica pectina. Estos ácidos pectínicos presentan la capacidad de formar geles con azúcares o ácidos y, si el grado de esterificación es bajo, con otros compuestos como las sales de calcio (Hoondal y col., 2002).

La pectinólisis no sólo tiene un papel fundamental para los microorganismos, sino también para las plantas, adquiriendo suma importancia en todos aquellos procesos que requieren la elongación de la pared celular (Hadfield y col., 1998). Por ejemplo, se ha descrito actividad pectinasa asociada con procesos de abscisión (Taylor y col., 1990), maduración de fruto (Downs y col., 1992), desarrollo del polen (Pressey y Reger, 1989) y germinación de semillas (Sitrit y col., 1999).

De manera general, las pectinasas se pueden clasificar atendiendo a varios criterios: (i) según el sustrato sobre el que actúan, (ii) según el mecanismo de acción, trans-eliminación o hidrólisis y (iii) por el mecanismo de acción, modo endo, rompiendo la molécula al azar y liberando oligómeros de diferentes tamaños, o modo exo, actuando sobre el extremo no reductor y liberando dímeros o monómeros (Kashyap y col., 2001). En función de estos criterios, los principales tipos de pectinasas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de las pectinasas.

Enzima	EC número	Sustrato	Producto	Modo de acción
protopectinasa	n.d.*	protopectina	pectina	solubiliza la protopectina
pectinesterasa (PE) o pectinmetilhidrolasa	3.1.1.11	pectina	ácido péctico	desesterificación de los grupos metilo
pectinesterasa (PE) o pectinacetilesterasa	n.d.	pectina	ácido péctico	desesterificación de los grupos acetilo
polimetil-poligalacturonasa (PMG)	n.d.	pectina	oligogalacturonato metilado	hidrólisis de enlaces α -1,4-glicosídicos
poligalacturonasa (PG)	3.2.1.15 (endo) 3.2.1.67/82 (exo)	ácido péctico	oligogalacturonato	hidrólisis de enlaces α -1,4-glicosídicos
polimetilgalacturónico liasa (PMGL)	4.2.2.10	pectina	oligogalacturonato insaturado	trans-eliminación de enlaces α -1,4-glicosídicos
poligalacturónico liasa (PGL)	4.2.2.2 (endo) 4.2.2.9 (exo)	ácido péctico	oligogalacturonato insaturado	trans-eliminación de enlaces α -1,4-glicosídicos
n.d.*: no definido				

4.3. Endopoligalacturonasas fúngicas

Las endoPGs (EC 3.2.1.15) son enzimas que hidrolizan los enlaces α -1,4 del ácido péctico. Según la clasificación de Henrissat (1991), basada en la similitud de las secuencias aminoacídicas, estas enzimas forman parte de la familia 28 de las glicosil hidrolasas. Esta familia además incluye otras enzimas como exo-poligalacturonasas (EC 3.2.1.67) y exo-poligalacturonosidasa (EC 3.2.1.82) que actúan sobre el extremo no reductor del ácido péctico, liberando monogalacturonatos o digalacturonatos, respectivamente. También están incluidas en esta familia: ramnogalacturonasas (EC no definido), endo-xilogalacturonano hidrolasas (EC no definido) y ramnogalacturonano α -L-ramnopirano hidrolasas (EC 3.2.1.40).

Actualmente, hay descritas numerosas endoPGs de un gran número de hongos fitopatógenos (*Aspergillus flavus*, *A. niger*, *B. cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*) (Whitehead y col., 1995; Fraissinet-

Tachet y Fevre, 1996; Di Pietro y Roncero, 1998; Centis y col., 1997; Wubben y col., 1999, Parenicová y col., 2000a), así como de bacterias (*Erwinia carotovora*, *Xylella fastidiosa*) (Pickersgill y col., 1998; Roper y col., 2007). En muchos casos, se ha comprobado la existencia de familias multigénicas de endoPGs como es el caso de *B. cinerea* (Wubben y col., 1999) y *S. sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet y col., 1995) y, más recientemente, en el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* (Götesson y col., 2002) y el basidiomiceto *Chondrostereum purpureum* (Williams y col., 2002).

La mayoría de las poligalacturonasas (PGs) pertenecientes a la familia 28 y descritas en la base de datos *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZy) (Coutinho y Henrissat, 1999) (<http://www.cazy.org/>), pertenecen a bacterias, plantas y hongos, siendo las de estos últimos principalmente endoPGs. Entre las pocas referencias bibliográficas sobre exopoligalacturonasas (exoPGs) fúngicas se encuentran las de *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig y col., 1998), *F. oxysporum* (García-Maceira y col., 2000) y las de los aspergilli, *A. niger* (Martens-Uzunova y col., 2006) y *Aspergillus tubingensis* (Kester y col., 1996).

Un estudio realizado por Markovic y Janecek (2001) sobre el alineamiento de 115 secuencias aminoacídicas de endoPGs y exoPGs de bacterias, plantas y hongos, obtenidas de la base de datos CAZy, muestra la relación evolutiva que existe entre este grupo de enzimas. Este estudio muestra la separación de PGs de bacterias, plantas y hongos, en tres grupos principales, quedando perfectamente separados los dos modos de acción enzimática, exo y endo, de las PGs fúngicas.

Estos tipos de análisis demuestran el alto grado de homología que presentan las endoPGs a nivel aminoacídico, siendo generalmente, del 60 al 65%, excepto para *Fusarium moniliforme*, cuya homología con una endoPG de *S. sclerotiorum* es del 40%. Aunque también se pueden encontrar similitudes de más del 80%, así varias endoPGs de *S. sclerotiorum* muestran homologías del 85 y 90% con endoPGs de *B. cinerea* (Kasza y col., 2004). Por otro lado, el porcentaje de homología entre las endoPGs fúngicas y las de plantas y bacterias baja hasta un 20% (Annis y Goodwin, 1997). Sin embargo, los estudios con secuencias de genes relativos a estas proteínas muestran unas homologías muy bajas.

Se ha determinado que el tamaño de los genes relativos a la mayoría de las endoPGs está entre 1100 y 1350 pb, presentando de uno a cuatro intrones de tamaños que varían desde los 50 pb hasta los 81 pb (Annis y Goodwin, 1997), aunque se pueden encontrar endoPGs que carecen de intrones, como ocurre en *S. sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet y col., 1995) y *B. cinerea* (ten Have y col., 2001). Otros análisis han revelado que la mayoría de las endoPGs presentan un péptido señal, de 20 a 40 aminoácidos, y que la proteína madura tiene una masa molecular entre 33 y 38 kDa (Annis y Goodwin, 1997).

Por otra parte, el gran número de endoPGs que aparecen en las bases de datos podría deberse a la presencia de múltiples genes y/o a la presencia de múltiples isoenzimas producidas, por modificaciones post-traduccionales (glicosilación o proteolisis), a partir de una o muy pocas proteínas. Está descrito que los genes de las endoPGs se organizan en familias cuyos componentes muestran un alto grado de polimorfismo (D'Ovidio y col., 2004a), aunque también se ha descrito la presencia de genes únicos como en *F. moniliforme* que produce cuatro endoPGs a partir de un único gen (Caprari y col., 1993). Una posible causa de la presencia de familias multigénicas o de múltiples isoenzimas podría estar relacionada con el número de hospedadores (Wubben y col., 2000) o con una mayor capacidad adaptativa para el patógeno en el proceso de infección (Keon y col., 1987). Aunque también hay casos en los que el elevado número de copias de genes relativos a endoPGs, presentes en el genoma de un hongo, no muestra una correlación con su rango de hospedador, así ocurre en el patógeno *Phytophthora infestans* (Yan y Liou, 2005).

Cabe destacar una regulación transcripcional para este tipo de genes. Wubben y col. (2000) enumeró cuatro mecanismos de regulación para los mismos: (i) expresión basal, (ii) inducción por monómeros de pectina, (iii) represión por glucosa y (iv) regulación por pH. Esta clasificación ha sido avalada por numerosos estudios en hongos como *A. niger* (Parenicova y col., 2000a) y *B. cinerea* (Wubben y col., 2000).

Se ha demostrado la influencia del pH en la expresión de estos genes (Wubben y col., 2000; de Vries y Visser, 2001). La secuencia consenso reconocida por el factor de transcripción *PacC*, (GCCARG), se ha localizado en los promotores de genes que codifican endoPGs en numerosas especies del género *Aspergillus* (de Vries y Visser, 2001). Sin embargo, esa secuencia no se ha encontrado en los promotores de estos genes en *B. cinerea* (Wubben y col., 2000) aunque se ha observado una clara regulación de ellos por pH. El factor *PacC* está positivamente regulado a pHs altos, así estos genes se transcriben en condiciones alcalinas y se reprimen en condiciones ácidas (Rollins, 2003).

También se ha demostrado que un homólogo del represor por fuente de carbono, *CreA*, estaría involucrado en la represión de estos genes. Se ha localizado la secuencia (SYGGRG) de unión a este factor de transcripción en la mayoría de los promotores de genes relativos a endoPGs que presentaron represión catabólica (Di Pietro y Roncero, 1998; Reymond-Cotton y col., 1996; Yan y Liou, 2005). No obstante, se han descrito también genes que no están sometidos a represión por fuente de carbono como los de la familia de las endoPGs neutras del hongo necrotrófico *S. sclerotiorum* (Cotton y col., 2003).

Por otra parte, el estudio del promotor del gen *Clpg2* de *C. lindemuthianum* reveló la presencia de dos elementos *cis* (TLE y PLE) relacionados con la expresión del

gen durante el crecimiento saprofítico del hongo en pectina y durante el ataque a la planta (Herbert y col., 2002, 2004).

La expresión secuencial de los genes que codifican endoPGs permitiría explicar una actuación diferencial de sus enzimas sobre la pared de la planta. Así, genes que se expresan constitutivamente originarían las enzimas que actuarían en las primeras etapas de colonización del tejido vegetal para liberar OGAs que, a su vez, provocarían una inducción de los genes de las endoPGs que actuarían, en las etapas posteriores, en la maceración del tejido (Cotton y col., 2003; Kasza y col., 2004). Por otra parte, el cambio en el pH del medio que ocurre a medida que el hongo interacciona con la planta determina un cambio en la expresión de los distintos genes y, por tanto, la aparición secuencial de endoPGs en el medio (Rollins y col., 2003).

Los patrones de expresión de genes que codifican endoPGs observados *in vitro* contribuyen a entender sus expresiones *in planta*. Estudios realizados con *B. cinerea in planta*, han demostrado que variables como el huésped, la etapa de infección o la temperatura, afectan también a la expresión de este tipo de genes (Wubben y col., 2000; Herbert y col., 2004).

Hay numerosos estudios que relacionan directamente las endoPGs con la capacidad virulenta de los hongos. Estudios realizados con dos endoPGs básicas, no reprimidas por glucosa, en los hongos fitopatógenos *A. flavus* y *B. cinerea*, concluyeron que éstas contribuían a su virulencia (Shieh y col., 1997; ten Have y col., 2001). También, Oeser y col. (2002), obtuvieron una reducción en la patogénesis del 98% trabajando con los disruptantes *Cppg1* y *Cppg2* de *Claviceps purpurea*. Sin embargo, estudio realizado en *C. carbonum* (Scott-Craig y col., 1990) y *Cryphonectria parasitica* (Gao y col., 1996), demostraron su no implicación en virulencia. Y estudios realizados en *F. oxysporum*, determinaron que la disrupción de *pg1* o *pg5* no provocaba una disminución en la patogénesis de los mutantes en relación con la cepa silvestre (Di Pietro y col., 1998; García-Maceira y col., 2001). Mientras que en un estudio realizado con el mutante A336 de *B. cinerea*, que es incapaz de colonizar la planta hospedadora, se observó una elevada producción de la proteína BcPG1 (Kunz y col., 2006).

Otro aspecto importante de estas proteínas es el papel que juegan en la inducción de respuestas de defensa en la planta, a través de la producción de OGAs. Es bien conocida la capacidad elicitora de los OGAs, ya en 1981, Hahn relacionó los fragmentos de ácido galacturónico, con el aumento en la producción de fitoalexinas en soja (Hahn y col., 1981). Ridley y col. (2001) analizaron el papel de los OGAs, tanto en aspectos defensivos como en crecimiento y desarrollo de la planta. En este sentido, las respuestas de regulación que los OGAs tienen sobre la planta, estarían relacionadas con una actividad antagonista a las auxinas (Bellincampi y col., 1996; Mauro y col., 2002; Ferrari y col., 2008). Por ejemplo, los OGAs inhiben la formación de las raíces adventicias en plantas de tabaco transformadas con el oncogén *rolB* de *Agrobacterium*

rhizogenes; este oncogén, que se induce por auxinas, es capaz de aumentar la formación de raíces.

En cuanto a su papel en defensa, se ha descrito en planta, como respuesta a OGAs, desde la acumulación de fitoalexinas, síntesis de lignina y etileno, aumento del calcio citosólico, activación de proteínas de unión a GTP y aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) hasta la inducción de proteínas inhibitoras de poligalacturonasas (PGIPs) (D'Ovidio y col., 2004a) (Figura 8). Todas estas respuestas son generadas a través de complejas rutas de señalización (Ridley y col., 2001) y son dependientes del tamaño de la molécula elicitora, normalmente entre 10 y 15 residuos de ácido galacturónico (Reymond y col., 1995), de la planta y del tejido vegetal sobre el que actúan (Spiro y col., 1998). Estudios más recientes, Ferrari y col. (2008), han mostrado que en plantas de *A. thaliana* transformadas con la PGII modificada de *A. niger*, sin actividad enzimática, aumentaban los niveles de expresión de genes de defensa, con un efecto similar al observado en plantas silvestres tras la adición exógena de OGAs.

El complejo proteico que forman las endoPGs y las PGIPs ha sido analizado en numerosos sistemas patógeno-planta. Esta relación se caracteriza por una alta afinidad, reversibilidad y especificidad (Kemp y col., 2004). Estas características plantean la posibilidad de una coevolución de endoPGs y PGIPs (Stotz y col., 2000), bien por una adaptación de las PGIPs a la variabilidad de las endoPGs, tanto espacial como temporal, bien por una necesidad de las endoPGs de escapar a la inhibición de las PGIPs. Así, existe gran variabilidad de inhibidores a la hora de reconocer las endoPGs fúngicas (De Lorenzo y Ferrari, 2002). Por ejemplo, el cambio de un sólo aminoácido en una endoPG de *Fusarium verticillioides* modificó el nivel de inhibición ejercido por una PGIP de judía sobre esa enzima (Raiola y col., 2008). Analizando las estructuras terciarias de ambas proteínas, se ha comprobado que las endoPGs de plantas poseen un triptófano en el sitio catalítico que no se encuentra en las de hongos. La inserción de un triptófano en la endoPG de *F. moniliforme*, en la posición correspondiente de las plantas, provocó que la PGIP-2 de *Phaseolus vulgaris* fuera incapaz de reconocer esa endoPG. Y, a pesar de la mutación, esa endoPG seguía siendo funcional pero a niveles mucho menores (Federici y col., 2001). Este hecho demuestra la capacidad de las endoPGs de plantas para evitar la inhibición por sus propias PGIPs.

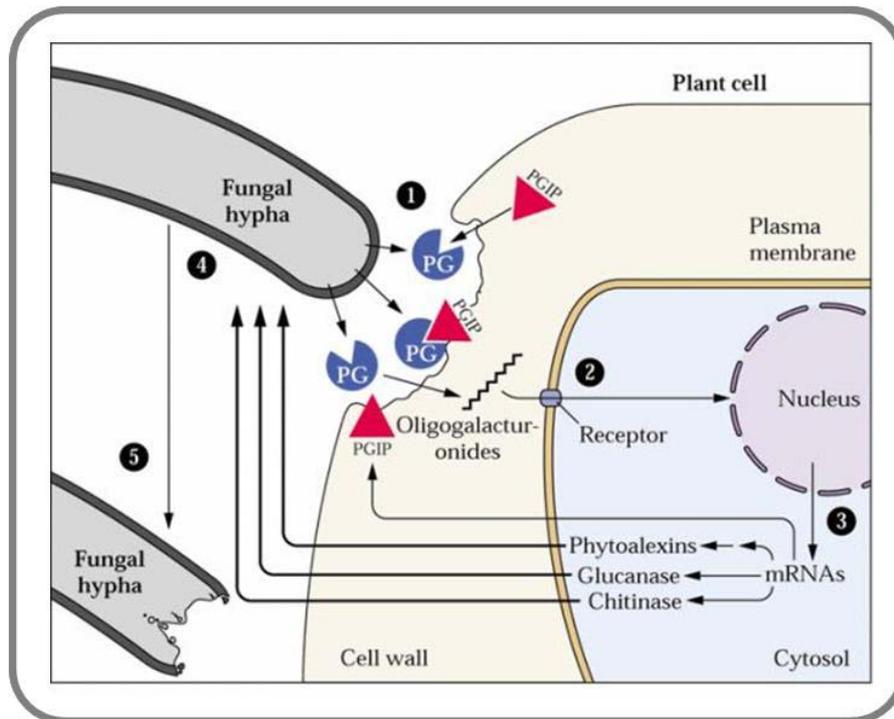


Figura 8. Representación esquemática de la interacción PG-PGIP, tomado de (Buchanan y col., 2000).

Por otro lado, el análisis de la estructura primaria de las pectinasas, ha permitido determinar que el mecanismo de acción de estas enzimas se lleva a cabo mediante dos mecanismos, principalmente: “retención” e “inversión” (Davies y Henrissat, 1995). Estudios posteriores, han demostrado que las endoPGs hidrolizan el sustrato a través de un mecanismo de inversión en el carbono anomérico (Biely y col., 1996). Los estudios realizados con endoPGs de *A. niger* (van Santen y col., 1999; Armand y col., 2000), *F. moniliforme* (Federici y col., 2001) y *E. carotovora* (Pickersgill y col., 1998), mediante mutagénesis dirigida o análisis cristalográfico de la proteína, han permitido determinar los aminoácidos que forman parte del centro catalítico. Estos estudios, junto con análisis comparativos de distintas endoPGs desarrollados por Stratilova y col. (1996), han propuesto cuatro dominios altamente conservados: $\text{Asn}^{178}\text{-X-Asp}^{180}$, $\text{Asp}^{201}\text{-Asp}^{202}$, $\text{Gly}^{222}\text{-His}^{223}\text{-Gly}^{224}$ y $\text{Arg}^{256}\text{-Ile}^{257}\text{-Lys}^{258}$. Comparando las secuencias disponibles, en las bases de datos, para PGs de bacterias, hongos y plantas, van Santen y col. (1999), determinó que sólo ocho de estos aminoácidos estarían estrictamente conservados, y dentro de éstos, los aminoácidos Asp^{180} , Asp^{201} , Asp^{202} e His^{223} estarían implicados en la hidrólisis del sustrato, mientras que los aminoácidos Arg^{256} y Lys^{258} estarían implicados en la unión al mismo. Stratilova y col. (1996) y Pages y col. (2000) han mostrado la presencia de la Tyr^{291} en 24 PGs analizadas y su importancia en el centro activo de la enzima. La numeración de los aminoácidos citados corresponde a la posición que ocupan en la secuencia de la endoPG de *A. niger*, PG2.

Otro aspecto importante de la estructura primaria de las endoPGs, son las modificaciones post-traduccionales del extremo amino-terminal, que determinan la secuencia de la proteína madura. De manera general, las endoPGs son sintetizadas como precursores, presentando una secuencia, de 16 a 21 aminoácidos, que constituye el péptido señal (Bussink y col., 1990, 1991; Parenicová y col., 2000b). No obstante, en algunas endoPGs, se ha observado la presencia de un prepro-péptido, localizado entre el péptido señal y la secuencia que codifica para la proteína madura (Yan y Liou, 2005). Otro elemento importante que determina la estructura y funcionalidad de las endoPGs es el proceso de glicosilación. El análisis de los posibles sitios de glicosilación de la PGA de *A. niger* determinó su importancia en la interacción PG-PGIP y, por tanto, en la patogénesis (Woosley y col., 2006).

A pesar de los numerosos estudios de endoPGs fúngicas, aún existe controversia sobre el verdadero papel que juegan estas enzimas en la virulencia. La demostración directa de que las endoPGs constituirían un factor de virulencia, requiere la aplicación de técnicas de ADN recombinante, como la delección o sobreexpresión de un único gen, y este punto resulta complicado por la presencia de familias multigénicas.

5. GENÓMICA FUNCIONAL

5.1. Concepto

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

La secuenciación del primer genoma, el bacteriófago ϕ X174, abrió la era de la genómica (Sanger y col., 1978). En la actualidad, la genómica está en un momento de transición o evolución, se está pasando del “mapeo” y secuenciación de genomas al estudio de la función de los genes. Por esta razón, el análisis de genomas se divide en “Genómica Estructural” (la generación y análisis de información sobre los genes de un genoma) y “Genómica Funcional” (la generación y análisis de información sobre lo que hacen los genes). El objetivo de la genómica funcional es conseguir la mayor información posible sobre los genes de la forma más rápida.

A partir del concepto de Genómica han surgido otros términos que son equivalentes lingüísticos de genómica pero referidos a otros campos de estudio, dentro de los cuales se incluyen: Proteómica, Transcriptómica y Metabolómica.

Proteómica es el estudio del proteoma o conjunto de proteínas que se expresan diferencialmente a lo largo de la vida de la célula. Transcriptómica es el estudio del ARN y de los genes que son transcritos de forma activa. El desarrollo y la diferenciación de una célula o un organismo, así como la adaptación a condiciones variables, se determina en gran medida por el perfil de expresión génica. Metabolómica es el estudio de los metabolitos y de las redes metabólicas.

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 a tiempo concreto. Las ESTs se agrupan en conjuntos de secuencias redundantes (contigs) y no redundantes (uniseuencias) en los que cada grupo representa un gen putativo único en el genoma del organismo (Skinner y col., 2001).

5.2. Genómica funcional de hongos filamentosos

Los hongos filamentosos constituyen la base de muchas aplicaciones biotecnológicas: desde el desarrollo y producción de diferentes fármacos (por ejemplo, los antibióticos β -lactámicos) y enzimas industriales (entre otras muchas, celulasas y lipasas), hasta su uso como sistemas para la expresión homóloga y heteróloga de diferentes productos génicos. A pesar de la gran importancia de los hongos filamentosos, los recursos que se destinan a su estudio son muy limitados en comparación con el esfuerzo total que se está llevando a cabo en otros campos de la genómica (Yoder y Turgeon, 2001). En cuanto a *Trichoderma*, aunque se trata de un género con un gran interés biotecnológico, su genoma se ha estudiado de forma muy escasa en comparación con otros microorganismos.

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios de ESTs de hongos filamentosos y oomicetos, incluyendo entre otros *Neurospora crassa* (Nelson y col., 1997), *Pleurotus ostreatus* (Lee y col., 2002), *Verticillium dahliae* (Neumann y Dobinson, 2003), *Metarhizium anisopliae* (Freimoser y col., 2003), *Gibberella zeae* (Trail y col., 2003), *Aspergillus oryzae* (Maeda y col., 2004), *Ustilago maydis* (Nugent y col., 2004; Austin y col., 2004), *Magnaporthe grisea* (Ebbolle y col., 2004), *Mycosphaerella graminicola* (Keon y col., 2005), *P. parasitica* (Panabieres y col., 2005) o *Uromyces fabae* (Jakupovic y col., 2006).

5.3. Genómica funcional de *Trichoderma*

En cuanto al género *Trichoderma*, hay varios trabajos publicados de genómica. El primero fue un análisis de ESTs y *microarrays* en el que se estudiaba la degradación aerobia y anaerobia de la glucosa en *T. reesei* QM9414 (Chambergo y col., 2002). Se secuenciaron 2.835 clones de ADNc que correspondían a 1.151 transcritos únicos y el genoma mitocondrial completo de *T. reesei*. La base de datos completa de ESTs se encuentra en la página web: <http://trichoderma.iq.usp.br/TrEST.html>.

Foreman y col. (2003) secuenciaron 18.000 ESTs a partir de una única genoteca de ADNc, que correspondieron a 5.131 secuencias únicas de *T. reesei* QM6a. Estos autores identificaron 12 enzimas implicadas en la degradación de biomasa y, mediante un análisis de *microarrays*, observaron que estas enzimas estaban reguladas transcripcionalmente.

Diener y col. (2004) estudiaron, mediante análisis de ESTs, las rutas de secreción y procesamiento de proteínas en *T. reesei* QM6a. Se secuenciaron 21.888 ESTs a partir de dos genotecas diferentes de ADNc, que correspondieron a 7.943 transcritos únicos.

Liu y Yang (2005) identificaron distintos genes implicados en el control biológico. Secuenciaron 3.298 ESTs, a partir de una única genoteca de *T. harzianum*, que correspondieron a 1.740 transcritos únicos.

Arvas y col. (2006) identificaron genes que se expresan diferencialmente en respuesta a determinadas condiciones de estrés en *T. reesei* Rut-C30. Se secuenciaron 2.047 ESTs a partir de dos genotecas substractivas de ADNc, que correspondieron a 457 secuencias únicas.

Además de estos trabajos basados en la generación de ESTs, un proyecto de genómica estructural realizado por el *Joint Genome Institute* (JGI, dependiente del Departamento de Energía de los EE.UU.) ha proporcionado la secuencia completa del genoma de la cepa QM 9414 de *T. reesei* (34 Mbp). Toda la información relacionada con los 9.129 genes de este trabajo se encuentra en la página web: <http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html> (versión 2.0).

En este sentido, Martínez y col. (2008) realizaron un análisis detallado de un total de 97 *contigs* del genoma de *T. reesei*. Mediante una comparación con otros 13 genomas de hongos, determinaron una baja representación de genes que codifican glicosil hidrolasas a pesar de que esta cepa se caracteriza por su habilidad para degradar polímeros de plantas.

En diciembre de 2007, el JGI liberó 31.938 ESTs de calidad del genoma completo de *T. virens* Gv29-8 (38.8 Mbp), de las que 6.599 ESTs están agrupadas en contigs, con un número estimado de 11.643 genes (<http://shake.jgi-psf.org/Trive1/Trive1.home.html>) (C. M. Kenerley, comunicación personal).

Recientemente, en junio de 2008, el JGI terminó de secuenciar el genoma de *T. atroviride* IMI206040 (36.1 Mbp), con un total de 31.938 ESTs de calidad secuenciadas de las que 8.051 aparecen agrupadas en contigs, con un número estimado de 11.100 genes. El acceso a esta información se encuentra en la página web (<http://shake.jgi-psf.org/Triat1/Triat1.home.html>) protegido por un código de acceso (C.P. Kubicek y C. M. Kenerley, comunicación personal). Actualmente, nuestro grupo está colaborando en la anotación comparativa de los genomas de *T. virens* y *T. atroviride* (M.R. Hermosa y E. Monte, comunicación personal).

El proyecto de genómica funcional *TrichoEST*, consorcio internacional financiado por la Unión Europea que engloba el presente trabajo, ha tenido como objeto la identificación de genes y productos génicos de *Trichoderma* spp. con alto valor biotecnológico. Se construyeron 26 genotecas de ADNc, utilizando poblaciones de ARNm obtenidas bajo condiciones que simulaban procesos de biocontrol, estreses nutritivos e interacción con planta, a partir de 10 cepas pertenecientes a 8 especies diferentes de *Trichoderma* (Rey y col., 2004). Toda la información relacionada con este proyecto se encuentra en la página web: <http://www.trichoderma.org>. De los casi 34.000 clones que se secuenciaron en el proyecto, 8.710 ESTs procedían de 8 genotecas de ADNc de la cepa *T. harzianum* T34. Un análisis *in silico* de estas últimas, identificó 3.478 transcritos únicos y la abundancia relativa de estas ESTs proporcionó una medida de la expresión génica. Además, se identificaron proteínas putativas secretadas y se compararon los datos disponibles de *T. harzianum* T34 con las colecciones de ESTs de otras especies de *Trichoderma* y, a su vez, con las bases de datos de secuencias genómicas obtenidas de otros hongos, animales y plantas (Vizcaíno y col., 2006). Del total de ESTs, 8.160 procedían de 4 genotecas obtenidas a partir de las cepas *T. longibrachiatum* T52, *T. asperellum* T53, *T. virens* T59 y *Trichoderma* spp. T78. El análisis *in silico* de estas ESTs reveló que el número de transcritos únicos era muy similar en todas las cepas, por ejemplo 1.012 correspondían a *T. virens* T59 (Vizcaíno y col., 2007).

6. ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA

6.1. Silenciamiento génico

Una de las estrategias más efectivas 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 representa uno de esos casos en los que la frecuencia de recombinación homóloga es baja (alrededor del 2% en *T. reesei*) aunque varía según la cepa (Mach y Zeilinger, 1998). Por ello sólo se han descrito algunos casos de interrupciones génicas con éxito en las especies como *T. virens*, *T. atroviride*, *T. reesei* (Mach y col., 1994; Wilhite y col., 2001; Zeilinger, 2004) y, más recientemente, en la cepa T34 de *T. harzianum* (Rubio, 2007; Rosado y col., 2007; Rubio y col., 2008), con la que se aborda el estudio del gen *Thpg1* en esta Tesis Doctoral.

En *T. harzianum*, la estrategia de silenciamiento ha permitido asignar función a genes que participan en la ruta de biosíntesis de terpenos y, a su vez, relacionarlos con el biocontrol (Cardoza y col., 2006a; Cardoza y col., 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).

El silenciamiento génico mediado por ARN es un mecanismo regulador de la expresión que suprime, a nivel post-transcripcional, la expresión de un gen por especificidad de secuencia. Este sistema está descrito en diferentes clases de organismos eucariotas, hongos como *N. crassa* (Romano y Macino, 1992), plantas (Napoli y col., 1990) o animales (Elbashir y col., 2001). Cabe destacar que Andrew Z. Fire y Craig C. Mello recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2006 por sus trabajos con siRNA para analizar la regulación de la expresión génica en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire y col., 1998).

El mecanismo común descrito actualmente, parte del ARN producido por los transgenes o transposones. Estos ARNs son reconocidos por la maquinaria de silenciamiento y desencadenan la respuesta. 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 ARN de interferencia (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 (Figura 9) (Agrawal y col., 2003).

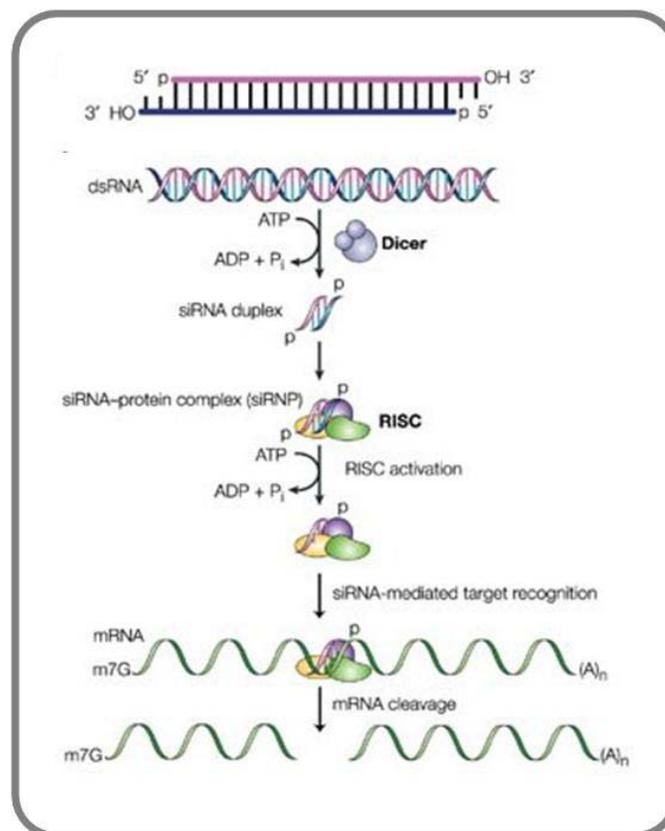


Figura 9. Esquema general del proceso de silenciamiento mediado por siRNA (Dykxhoorn y col., 2003).

6.2. Expresión en sistemas homólogos y heterólogos

Otra estrategia para analizar la función de los productos génicos consiste en la sobreexpresión de los mismos 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 introducción de copias adicionales del gen *prb1* en *T. harzianum*, aumentó su capacidad antagonista frente a *R. solani* (Flores y col., 1997). La sobreexpresión en *T. longibrachiatum* del gen que codifica para una β -1,4-endoglucanasa incrementó su capacidad antifúngica frente a *Pythium ultimum* (Migheli y col., 1998). Y mediante la sobreexpresión constitutiva del gen *chit33* en *T. harzianum*, se obtuvo un aumento de la actividad antagonista frente a *R. solani* en ensayos antifúngicos *in vitro* (Limón y col., 1999). En este sentido, la sobreexpresión del gen que codifica para la quitinasa CHIT36 de *T. asperellum* en *Pichia pastoris* mantuvo su actividad micoparasítica frente a *Rhizoctonia solani* (Viterbo y col., 2002a). Por otra parte, transformantes de *T. harzianum* que sobreexpresan el gen que codifica una *heat shock protein* de *T. virens* (*hsp23*) mostraron una mayor resistencia a temperaturas extremas (Montero-Barrientos y col., 2007).

Uno de los sistemas heterólogos con el que se trabaja habitualmente es con planta. La expresión constitutiva del gen que codifica la quitinasa CHIT42 en plantas de tabaco y patata confirió resistencia a *R. solani*, *B. cinerea*, *A. alternata* y *A. solani* (Lorito y col., 1998). Además, la expresión de dos genes de *T. harzianum*, *chit33* y *chit42*, en plantas de tabaco confirió resistencia a *R. solani*, a salinidad y a metales pesados (Dana y col., 2006). Plantas transgénicas de algodón que expresan el gen *chit42* de *T. virens* fueron resistentes al ataque de *R. solani* y de *A. alternata* (Chandrakanth y col., 2003). Otros genes que codifican quitinasas fúngicas se han introducido, para conferir resistencia a hongos patógenos, en plantas como manzano (Bolar y col., 2001), brécol (Mora y Earle, 2001) o *B. juncea* (Mondal y col., 2003).

6.3. Tecnología de *microarrays*

En el campo de la genómica actual, los *microarrays* representan una herramienta útil a la hora de estudiar, de manera simultánea, la expresión de miles de genes. El acceso a colecciones de datos de perfiles de expresión de mutantes, tejidos o tratamientos, ofrece una herramienta para la identificación de la función de los genes (Rensink y Buell, 2005). Existen diferentes tipos de *microarrays* dependiendo del material de partida con el que se trabaje, proteínas, tejidos (TMA), ADN (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) o ARN (*microarrays* de expresión). Las primeras aproximaciones realizadas con *microarrays* de *Arabidopsis thaliana* por Affymetrix, representaban unos 8.000 genes únicos; en la actualidad, el *microarray* ATH1 de Affymetrix, representa unos 24.000 genes únicos de esta especie (Redman y col., 2004).

La tecnología de los *microarrays* está basada en la síntesis o fijación de sondas específicas, *probe*, que representan los genes, proteínas o metabolitos, sobre un sustrato sólido que permitirá la hibridación con la molécula diana, *target*, cuyo marcaje dependerá del tipo de *microarray* (Rensink y Buell, 2005). Actualmente existen dos tipos de *microarrays* de expresión: de ADNc y de oligonucleótidos (Schulze y Downward, 2001). Las ventajas que presentan los *microarrays* de oligonucleótidos con respecto a los de ADNc, es que tienen una fabricación rápida y más robotizada, presentan una elevada reproducibilidad y especificidad, ya que se utilizan secuencias cortas y muchas sondas por gen. Por contra, requiere equipamiento más especializado, por lo que su coste es elevado, y presenta poca flexibilidad en el diseño experimental.

6.4. Proteómica

En la última década, el uso de la proteómica se ha convertido en una herramienta más para el estudio de la función génica, tomando como punto de partida el conjunto de proteínas que son producidas por el genoma de un organismo en un momento concreto. La proteómica permite obtener una visión global, de los procesos que ocurren dentro de la célula, incluyendo variaciones en los niveles de expresión, modificaciones post-traduccionales, interacciones entre las proteínas o su localización (Rey y col., 2004).

Las modificaciones que puede sufrir el proteoma de un organismo, pueden ser visualizadas mediante el uso de electroforesis en dos dimensiones (2D SDS-PAGE). En los últimos años, el uso de esta técnica ha permitido obtener información sobre el perfil proteico producido en situaciones de patogénesis (Lim y Elenitoba-Johnson, 2004). En este sentido, se han llevado a cabo numerosos estudios relacionados con la interacción planta-microorganismo. Por ejemplo, se ha analizado el proteoma de la cepa P1 de *T. atroviride* en su interacción con planta y diferentes hongos fitopatógenos (Marra y col., 2006) y, el estudio del proteoma de *T. harzianum* T34 en presencia de diferentes paredes celulares de hongos, ha permitido la identificación de una aspartil proteasa implicada en micoparasitismo (Suárez y col., 2005).

OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto de genómica funcional del género *Trichoderma* dirigido a la identificación de genes con valor biotecnológico en este hongo. *T. harzianum* es conocido por ser un agente de control biológico. Sus habilidades como micoparásito están bien estudiadas y documentadas en numerosos patosistemas. Sin embargo, todavía es escaso el conocimiento que se tiene de su interacción con la planta, aunque a nivel empírico se haya demostrado que este hongo es capaz de estimular el crecimiento de las plantas y aumentar la productividad de numerosos cultivos. Aunque *Trichoderma* tiene la capacidad de degradar el material vegetal, es considerado como un organismo avirulento que induce respuestas de defensa en la planta. En este sentido, se ha demostrado que la acción de las endoPGs libera moléculas elicitoras que desencadenan estas respuestas. Por tanto, el objetivo general de este trabajo ha sido el estudio, dentro del sistema pectinolítico, de una endopoligalacturonasa de *T. harzianum* y su relación con la planta. A continuación se detallan los objetivos particulares del mismo:

1. Aislamiento y caracterización del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34, que codifica una endopoligalacturonasa y su análisis funcional mediante silenciamiento génico en *T. harzianum* T34.
2. Análisis del transcriptoma de *A. thaliana* en la interacción con *T. harzianum* T34 o con el transformante ePG5 silenciado en el gen *Thpg1*.
3. Obtención y análisis de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ORGANISMOS UTILIZADOS

1.1. Bacterias

E. coli **DH5 α** (Hanahan, 1983). Cepa utilizada en experimentos de transformación por choque térmico debido a la alta eficacia que puede conseguirse con ella (hasta 5×10^8 transformantes por cada μg de ADN). Entre sus características destaca la de poseer una deleción en el gen *Z* del operón *lac* lo que permite seleccionar por color las células transformadas que contengan plásmidos que complementen dicha deleción, tales como, pGEM-T[®] Easy (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

E. coli **LE392** (Sambrook y Russel, 2001). Cepa susceptible de ser infectada por el bacteriófago lambda y sus derivados. Se utilizó para la amplificación de genotecas de ADN realizadas en vectores derivados del fago lambda.

Agrobacterium tumefaciens **C58C1** (Deblaere y col., 1985). Cepa utilizada para la transformación de plantas silvestres de *A. thaliana*. Contiene el plásmido binario desarmado pGV2260 que lleva los genes *vir* necesarios para la integración del T-DNA en el genoma de la planta, y presenta resistencia a la rifampicina.

1.2. Hongos filamentosos

1.2.1. Cepas de *Trichoderma*

Las cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 2.

1.2.2. Hongos fitopatógenos

Las cepas de hongos fitopatógenos utilizadas en este trabajo fueron: *B. cinerea* cepa 26, aislada de tabaco, y *P. ultimum* cepa 8 y *R. solani* cepa 19, aisladas de tomate. Estos hongos, proporcionados por el Dr. Matteo Lorito, fueron aislados en el Departamento de Arboricoltura e Patologia Vegetale de la Universidad de Nápoles.

1.3. Material vegetal

Se utilizó *A. thaliana* L. ecotipo Columbia (Col-0) para la expresión heteróloga de genes de *Trichoderma* utilizando un método de transformación mediado por *A.*

tumefaciens. Este ecotipo forma parte de la colección del *Arabidopsis Information Service*.

Para la realización de estudios de expresión en un sistema de tres componentes se utilizaron semillas pildoradas de *Lycopersicon esculentum* var. *manitu híbrido* (Ramiro Arnedo S.A., Calahorra, La Rioja).

Tabla 2. Cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo.

Referencia	Especie	Cepa ^a	Fuente ^b	Origen geográfico
T11	<i>T. atroviride</i>	IMI 352941	suelo	Francia
T22	<i>Trichoderma</i> spp.	ATCC 20847	—	EE.UU.
T25	<i>T. asperellum</i>	IMI 296237	suelo	Colombia
T34	<i>T. harzianum</i>	CECT 2413	suelo	EE.UU.
T52	<i>T. longibrachiatum</i>	NBT 52	planta de tratamiento de agua	Eslovaquia
T59	<i>T. virens</i>	NBT 59	suelo de tabaco con quitosano	España

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

ATCC, *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EE.UU.

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

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

^b La cepa T22 fue obtenida mediante fusión de protoplastos.

2. VECTORES

2.1. Vectores plasmídicos

- **pGEM-T[®] Easy** (Promega) (3015 pb). Plásmido utilizado para la clonación de fragmentos de PCR que presenta las siguientes características: deriva del vector pGEM[®]-5Zf(+) digerido con *EcoRV* y al que se le han añadido dos residuos de timidina en los extremos 3', esto permite la clonación de productos de PCR generados por polimerasas que añaden un nucleótido adenina en los extremos 3'; contiene un sitio de clonación múltiple dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa, lo que permite identificar los clones recombinantes por el color y por su resistencia a la ampicilina (Figura 10); posee un origen de replicación monocatenaria del fago f1.

- **pSIL** (Sousa, 2004) (5257 pb). Plásmido utilizado en el silenciamiento de la expresión génica del gen *Thpg1* de *T. harzianum* CECT 2413. Se construyó mediante la clonación sucesiva de diferentes fragmentos en el vector pBluescript SK(+). Contiene el promotor del gen *ta* de *T. harzianum*, un fragmento de 159 pb correspondiente a uno de los intrones de la secuencia genómica de *T. harzianum* T34 y el terminador del gen de la celobiohidrolasa 2 (*cbh2*) de *T. reesei* T59 (Figura 10).
- **pJL43b1** (Gutiérrez y Martín, no publicado) (4488 pb). Plásmido utilizado para la transformación de protoplastos de *T. harzianum*. Contiene el promotor del gen gliceraldehido 3-P-deshidrogenasa A (*gpdA*) de *Aspergillus nidulans*, el terminador del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (*cyc1*) de *S. cerevisiae* y el gen de resistencia a la fleomicina (*ble*) de *Streptoalloteichus hindustanus* (Figura 10).
- **pBI121** (Chen, 2003) (14758 pb). Plásmido utilizado para la transformación de *A. tumefaciens* C58C1. Es un vector binario derivado de pBI19 y pBI221. Este plásmido contiene el gen que codifica la β -glucuronidasa (GUS) flanqueado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen que codifica la nopalina sintasa (NOS) de *A. tumefaciens*. El gen que codifica la neomicina fosfotransferasa II (NPTII) permite seleccionar los transformantes por su resistencia a la kanamicina. Esta región delimitada por el borde derecho (RB) e izquierdo (LB), constituye el T-DNA que se integrará en el genoma de *A. thaliana* (Figura 10).
- **pGEM-fThpg1 y pGEM-rThpg1** (3464 pb). Vectores derivados de pGEM-T en los que se subclonó un fragmento de 440 pb del gen *Thpg1* y su secuencia invertida, respectivamente. Estos vectores se utilizaron como intermediarios en la construcción del vector pSIL-*Thpg1*.
- **pSIL-*Thpg1*** (6139 pb). Este vector se construyó a partir del plásmido pSIL mediante la inserción de dos fragmentos de 440 pb del gen *Thpg1* en orientaciones invertidas. Este vector se utilizó para llevar a cabo el silenciamiento del gen *Thpg1* en *T. harzianum* T34.
- **pJL43b1-*Thpg1*** (7456 pb). Vector derivado de pJL43b1 en el que se subclonó el fragmento que comprende el promotor del gen *ta*, las secuencias invertidas del gen *Thpg1* separadas por uno de los intrones de *T. harzianum* T34 y el terminador del gen *cbh2* de *T. reesei*. El proceso de construcción del vector se detalla en el apartado 6.1.
- **pGEM-*Thpg1*** (4170 pb). Vector derivado del vector pGEM-T en el que se subclonó el gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34. Se utilizó como intermediario en la construcción del vector pBI121-*Thpg1*.

- Los promotores fágicos SP6 y T7 situados uno en cada brazo (SP6, brazo derecho; T7, brazo izquierdo).
- Sitios para *Sfi*I asimétricos flanqueando la región de clonación.

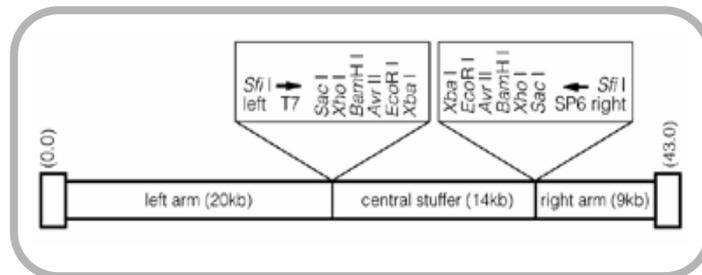


Figura 11. Esquema del bacteriófago λ GEM[®] -11.

3. MEDIOS DE CULTIVO

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

3.1. Medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos

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

Composición:

NaCl	10 g
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g

H₂O destilada c.s.p. 1 L

Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 1 M

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

El medio se suplementó con ampicilina (100 µg/mL) para la selección de bacterias portadoras de plásmidos con resistencia al antibiótico. Para bacterias portadoras de plásmidos con selección por color (β -galactosidasa), el medio se suplementó con IPTG (25 µM) y X-gal (50 µg/mL). Para el crecimiento de bacterias que van a ser infectadas por bacteriófagos, el medio se suplementó con maltosa 0,2% (p/v) y sulfato magnésico 10 mM.

- **Medio NZY** (Miller, 1972). Medio empleado para el crecimiento de la cepa de *E. coli* LE392 infectada con bacteriófagos, y posterior formación de placas de lisis.

Composición:

NZ Amina tipo A (Sigma)	10 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g
Extracto de levadura	5 g

H₂O destilada c.s.p. 1 L

Se ajustó a pH 7,5 con NaOH

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

Para medio de cobertera se añadieron 7 g de agarosa por litro.

- **Medio SM.** Medio empleado para el mantenimiento de los bacteriófagos.

Composición:

NaCl	5,8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g
Tris-HCl 1 M, pH 7,5	50 mL
Gelatina al 2% (p/v)	5 mL

H₂O destilada c.s.p. 1 L

- **Medio SOC.** Medio empleado para la recuperación de *A. tumefaciens* después de su transformación mediante electroporación y para la preparación de células competentes de *E. coli*.

Composición:

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,50 g
KCl	0,19 g

H₂O destilada c.s.p. 1 L

Se ajustó el pH a 7,5 y una vez autoclavado y frío se añadieron 2 g de MgCl₂·6H₂O y glucosa 20 mM filtrados a esterilidad.

3.2. Medios de cultivo para hongos

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

Composición:

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

H₂O destilada c.s.p. 1 L

- **Patata dextrosa agar (PDA).** Se empleó como medio sólido general para el crecimiento de hongos.

Composición:

Extracto de patata	20 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1 L

Este medio se adquirió a Sigma, que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 39 g en 1 L de agua destilada.

- **Caldo de patata dextrosa (*Potato Dextrose Broth*, PDB).** Se empleó como medio de cultivo líquido general para el crecimiento de hongos.

Composición:

Extracto de patata	20 g
Glucosa	20 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1 L

Este medio fue adquirido a Sigma, que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 24 g en 1 L de agua destilada.

- **MEA.** Se empleó como medio sólido para el crecimiento de la cepa de *B. cinerea* utilizada en este trabajo.

Composición:

Peptona micológica	10 g
Extracto de malta	20 g
Agar	15 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1 L

- **Medio Mínimo (MM).** Medio líquido de crecimiento de *Trichoderma* (Penttilä y col., 1987) que se utilizó para estudios de expresión.

Composición:

KH ₂ PO ₄	15 g
Glucosa	20 g
Solución de metales traza (*)	1 mL
Se ajustó el pH a 5,5 con KOH 1M	
H ₂ O destilada c.s.p.	1 L

Para los ensayos en medio sólido se añadieron 15 g de agar por cada L de medio.

(*) Solución de metales traza preparada a una concentración 1000X:

▪ FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 g/L
▪ MnSO ₄ ·H ₂ O	1,6 g/L
▪ ZnSO ₄ ·H ₂ O	1,4 g/L
▪ CoCl ₂	2 g/L

Una vez esterilizado en autoclave se añadieron: 20 mL de (NH₄)₂SO₄ 250 mg/mL (esterilizado en autoclave), 4,1 mL de CaCl₂ 1M (esterilizado por filtración) y 2,4 mL de MgSO₄ 1M (esterilizado en autoclave).

☞ Este medio se utilizó en todos los casos para la obtención de biomasa o de crecimiento (primera fase). Para realizar los ensayos de expresión (segunda fase), la fuente de carbono y/o nitrógeno varió dependiendo de las condiciones requeridas en cada caso.

- **Medio TSA (*Tryptic Soy Agar*)**. Este medio se utilizó en la selección de transformantes de *Trichoderma*. Se añadieron 30 g/L de *tryptic soy broth* (TSB, Merck) y 15 g/L de agar técnico (Difco). Para regenerar los protoplastos se añadió sorbitol 1 M (USB, Amersham). Este medio se suplementó, cuando fue necesario, con fleomicina (200 µg/mL) para la selección de transformantes.

- **Agar-agua (AA)**. Este medio se empleó para los ensayos de interacción de *T. harzianum* T34-tomate-patógeno. Se preparó a una concentración de agar del 1%.

3.3. Medios de cultivo para plantas

- **Medio Murashige y Skoog (MS)** (Murashige y Skoog, 1962). Utilizado para la germinación de semillas de *A. thaliana* y de tomate. El medio se suplementó, cuando fue necesario, con kanamicina (50 µg/mL) para la selección de las plantas transformadas.

Composición:

Medio MS básico	4,9 g
Sacarosa	10 g
MES	500 mg
Agar	8 g
H ₂ O destilada c.s.p	1 L

Una vez ajustado el pH a 5,7 con KOH se esterilizó en autoclave.

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

☞ Para los cultivos de interacción *A. thaliana-Trichoderma* (ensayos de *microarrays*) el medio MS se preparó sin agar.

4. CULTIVO DE LOS ORGANISMOS

4.1. *Trichoderma*

4.1.1. 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 almacenaron a 4°C hasta su uso.

☞ En el caso de *B. cinerea* 26 el proceso fue similar al descrito para *Trichoderma*.

4.1.2. Cultivo para la obtención de germínulas

Para la obtención de germínulas (esporas que sólo han desarrollado el tubo germinativo), se inocularon en medio PDB esporas de *Trichoderma* a una concentración final de 10^6 esporas/mL, y se incubaron a 28°C, durante 15 h, en agitación (150 rpm). Para recoger las germínulas se centrifugó el micelio en condiciones estériles a 4.400 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Se lavó el micelio tres veces con agua estéril, centrifugando cada vez, en las mismas condiciones. Por último, el micelio se resuspendió en, aproximadamente, 25 mL de agua destilada estéril.

4.1.3. Cultivos para la extracción de ADN

Se utilizaron matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio PDB, inoculados con esporas de *Trichoderma* a una concentración final de 10^6 esporas/mL, que se incubaron a 28°C durante 36-48 h, en agitación (150 rpm). La biomasa obtenida se recogió mediante filtración por vacío a través de papel de filtro. El micelio se lavó con agua destilada estéril, se congeló a -80°C y se liofilizó durante unas 12 h, conservándose a -20°C hasta su utilización.

4.1.4. Cultivos para el análisis de la expresión génica

Estos cultivos se hicieron en dos fases. En la primera fase (preinducción o producción de biomasa) se inocularon matraces de 1 L conteniendo 300 mL de MM (Penttilä y col., 1987) con glucosa al 2% (p/v), con esporas de *Trichoderma* a una concentración final de 10^5 esporas/mL. Se incubaron a 28°C durante 36-40 h, en agitación (150 rpm). Transcurrido este tiempo, los cultivos se filtraron en condiciones de esterilidad mediante vacío a través de papel de filtro. Los micelios se lavaron con

agua destilada estéril, y se utilizaron para inocular los medios de inducción (segunda fase). Estos medios se prepararon a partir del mismo MM (Penttilä y col., 1987), en ausencia de fuente de carbono (glucosa al 0%), y con ciertas modificaciones en las condiciones nutricionales: presencia de glucosa al 2%, déficit de nitrógeno (usando una concentración 100 veces menor de sulfato amónico, 50 mg/L), ácido poligalacturónico (PGA) (Sigma) al 0,1 ó 0,5%, pectina (Sigma) al 0,1 ó 0,5%, planta de tomate al 1%, paredes celulares de *B. cinerea* 26, *R. solani* 19 o *P. ultimum* 8 al 1%. Los diferentes medios modificados se cultivaron a 28°C y 150 rpm durante un tiempo variable, entre 4 y 24 h.

☛ Para llevar a cabo extracciones de ARN (que se emplean en el análisis de la expresión génica), el micelio obtenido se recogió por filtración como se ha descrito para las preinducciones en el párrafo anterior. A continuación se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 12 h, conservándose a -80°C hasta su utilización.

☛ Para el estudio de la actividad endopoligalacturonasa se recogieron los sobrenadantes filtrados de los medios de inducción en todas las condiciones empleadas para realizar los estudios de expresión. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Plantas de tomate: se utilizaron hojas pulverizadas en un mortero, en presencia de nitrógeno líquido.

Paredes celulares de hongos: se prepararon según el método descrito por Fleet y Phaff (1974) a partir del micelio obtenido tras el crecimiento de *B. cinerea* 26, *R. solani* 19 o *P. ultimum* 8 en medio líquido PDB durante aproximadamente 7 días, según el hongo.

Para la obtención de las paredes celulares se siguió el siguiente protocolo:

1. Se centrifugó el medio con micelio autoclavado a 12000 g durante 10 minutos.
2. Se lavó el precipitado dos veces con agua desionizada y se recogió la biomasa centrifugando de nuevo.
3. Se resuspendió la biomasa en NaCl al 2% y se centrifugó en las mismas condiciones indicadas anteriormente desechando el sobrenadante.
4. Se lavó el precipitado tres veces con NaCl al 2% y otras tres veces con agua desionizada centrifugando cada vez.
5. El precipitado se secó parcialmente prensándolo con papel de filtro.
6. Se congeló y liofilizó para eliminar el agua por completo.
7. La biomasa liofilizada se pulverizó en un mortero y se guardó a temperatura ambiente hasta su utilización.

4.1.5. Cultivos para el análisis de la expresión génica en un sistema de tres componentes

Para la obtención de micelio de la cepa T34 se utilizó un sistema que simulaba una interacción T34-planta-patógeno *in vivo*. Para ello, se utilizaron plántulas de tomate crecidas durante 15 días en placas de agar-agua (AA). Estas plántulas se infectaron con una suspensión de *B. cinerea* 26, o con discos de agar (1 cm²) de *R. solani* 19 o *P. ultimum* 8, crecidos previamente en placas de PDA. Después de 4 días de incubación a 28°C, se colocó sobre estas placas, un celofán (CM) con micelio de la cepa T34 previamente crecido durante 48 h a 28°C en placas de PDA cubiertas con una membrana de CM estéril. Estas placas se inocularon con 100 µL de una suspensión de 5.10⁵ esporas/mL de la cepa T34. La membrana de CM utilizada permitió separar los patógenos de la cepa T34 pero permitiendo el paso de micro y macronutrientes (Kullnig y col., 2000).

4.1.6. Cultivos para la obtención de proteínas intracelulares en un sistema de tres componentes

Para la obtención de proteínas intracelulares de la cepa T34 se utilizó un sistema que simulaba una interacción *in vivo*, *Trichoderma*-planta-patógeno. Se utilizó el mismo sistema empleado para el análisis de la expresión génica descrito en el apartado anterior.

A. thaliana

4.2.1. Desinfección de semillas

Las semillas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 se lavaron con una solución de etanol al 70% y Triton X-100 al 0,1%. Después de 20 minutos en un agitador orbital, se retiró el sobrenadante y se añadió una solución de lejía al 2,5 % y Triton X-100 al 0,05%. Las semillas se agitaron durante 10 minutos, se dejaron precipitar, se retiró el sobrenadante, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se estratificaron a 4°C durante 3-5 días en ausencia de luz, como paso previo a su germinación, con el fin de sincronizar la germinación y eliminar la dormición.

4.2.2. Cultivo en placa

Una vez estratificadas las semillas, se retiró el agua, se resuspendieron en una solución de agarosa estéril al 0,15% y se germinaron en placas de MS durante dos semanas. Estas placas se incubaron a 21-24°C, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y una humedad del 70%.

4.2.3. Cultivo en maceta

Las plántulas de *A. thaliana* germinadas en placa se pasaron a macetas con una mezcla de turba (Gramoflor GmbH y Co., Oldenburg, Alemania) y vermiculita en proporción 3:1. Las macetas se taparon con papel transparente para mantener una atmósfera húmeda, y se incubaron durante 4-5 días en las condiciones antes descritas. Una vez retirado el papel transparente, las plantas se incubaron durante dos meses en las mismas condiciones, regándose cada tres días. Estas plantas se utilizaron para la recogida de semillas y de material vegetal.

☞ La mezcla de turba se compone de carbono orgánico al 35% y azufre orgánico al 0,3%, a un pH 6,0.

4.2.4. Cultivo en medio líquido

Para realizar el análisis del transcriptoma de *A. thaliana* se prepararon 18 matraces de 10 mL (2 matraces por cada réplica) a los que se añadió 8 mL de medio MS líquido. Cada matraz se inoculó con 10^5 germínulas/mL (según el protocolo de obtención descrito en el apartado 4.1.2) de la cepa T34, del transformante ePG5, o sin inóculo en el control negativo. La raíz de *A. thaliana* se introdujo hasta la roseta en el medio y sujeta al matraz con Parafilm[®]. Previamente, la raíz se pasó varias veces por agua estéril y lejía al 50% para desinfectar y eliminar los restos de tierra. El sistema se incubó durante 24 h en agitación suave a 25°C.

4.3. Tomate

4.3.1. Desinfección de semillas

De forma previa a la esterilización de las semillas, se retiró el pildorado por agitación en agua. Posteriormente, se realizó la esterilización mediante agitación, durante 10 minutos, en una solución de etanol al 70% y descartando el sobrenadante. Las semillas se lavaron por agitación, una vez en una solución de lejía al 50% y tres veces en agua estéril, retirando el sobrenadante en cada paso. Las semillas se dejaron secar y se guardaron en una placa Petri estéril a temperatura ambiente hasta su utilización.

4.3.2. Cultivo en tubos

Una vez esterilizadas las semillas, se retiró el agua y se germinaron en tubos de vidrio con MS durante dos semanas. Estos tubos se incubaron a 21-24°C, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y una humedad del 70%.

5. Mantenimiento

5.1. Bacterias

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

5.2. Hongos filamentosos

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

☛ En el caso de *R. solani* 19 y *P. ultimum* 8, se recogieron discos de agar que se mantuvieron en agua estéril y a temperatura ambiente.

5.3. Bacteriófagos

Los bacteriófagos se mantuvieron a 4°C en medio SM con cloroformo al 0,2% (v/v). Para preservarlos durante largos periodos de tiempo, se conservaron a -80°C en medio SM con DMSO al 7%.

5.4. Plantas

Las semillas de *A. thaliana* se mantuvieron a temperatura ambiente en tubos, *ependorf* o *falcon*, agujereados.

6. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

6.1. Construcción del vector pJL43b1-*Thpg1*

El vector pJL43b1-*Thpg1* se construyó a partir del vector pSIL mediante la inserción de un fragmento de 440 pb del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34, en orientaciones invertidas (Sousa, 2004). Ambos fragmentos se amplificaron en dos reacciones de PCR a partir de la ORF del gen *Thpg1* con los oligonucleótidos pSIL-1 y pSIL-2 para el fragmento *forward*, y pSIL-3 y pSIL-4 para el fragmento *reverse*, que incluían en su secuencia las dianas para las enzimas *SpeI*-*Bam*HI y *XhoI*-*Hind*III, respectivamente. Los dos fragmentos amplificados por PCR se subclonaron en dos pasos sucesivos en el vector pSIL, previamente digerido con las enzimas correspondientes, *SpeI* y *Bam*HI para el primer fragmento, y *XhoI* y *Hind*III para el segundo fragmento, dando lugar al plásmido pSIL-*Thpg1*. Este plásmido se digirió con *SacI*, liberando el *cassette* formado por el promotor del gen *ta* (*ta*) de *T. harzianum*, un primer fragmento de 440 pb del gen *Thpg1*, un fragmento de 159 pb correspondiente a uno de los intrones (I) de la secuencia genómica de *T. harzianum* T34, un segundo fragmento de 440 pb del gen *Thpg1* en orientación invertida respecto al primero y el terminador del gen de la celobiohidrolasa 2 (*cbh2*) de *T. reesei* T59. Este *cassette* se clonó en el plásmido pJL43b1, digerido con la misma enzima de restricción, dando lugar al plásmido pJL43b1-*Thpg1* con el que se transformó *T. harzianum* T34 (Figura 12).

☛ Los dos fragmentos amplificados con las secuencias dianas fueron subclonados en el vector pGEMT-Easy dando lugar a los plásmidos pGEM-f*Thpg1* y pGEM-r*Thpg1* como paso previo a la construcción del vector pSIL-*Thpg1* para aumentar el porcentaje de éxito en el proceso de ligación de los fragmentos al vector pSIL.

6.2. Construcción del vector pBI121-*Thpg1*

El vector pBI121-*Thpg1* se construyó amplificando la ORF del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34 utilizando ADN plasmídico como molde y los oligonucleótidos pBI-1 y pBI-2, que portaban sitios de corte para *XbaI* y *StuI*, respectivamente. El fragmento amplificado se subclonó en el vector pGEMT-Easy, y éste se digirió con *XbaI* y *StuI*, liberando el gen *Thpg1* con un extremo cohesivo y uno romo. Por otro lado, el plásmido pBI121 se digirió con las enzimas *XbaI* y *Eco*ICRI, liberando el gen que codifica para la β -glucuronidasa (GUS) y dejando un extremo cohesivo y un extremo romo, respectivamente. De este modo, la ligación del gen *Thpg1* en el plásmido pBI121 quedaba dirigida de forma correcta (Figura 13).

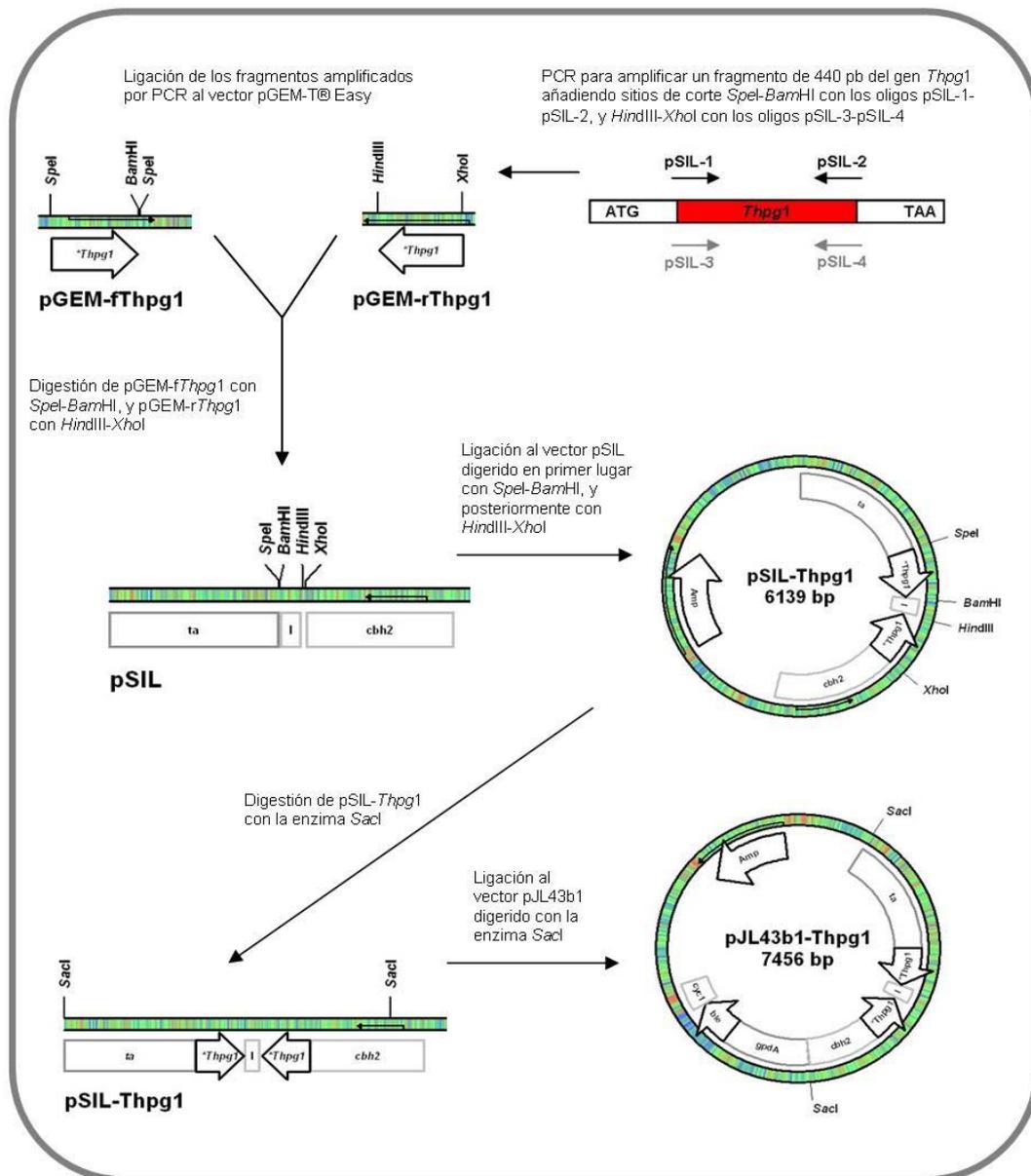


Figura 12. Esquema de la construcción del plásmido pJL43b1-*Thpg1*. *Amp^r*: gen de resistencia a ampicilina; *ble*: gen de resistencia a fleomicina. Para más detalles, consultar el texto.

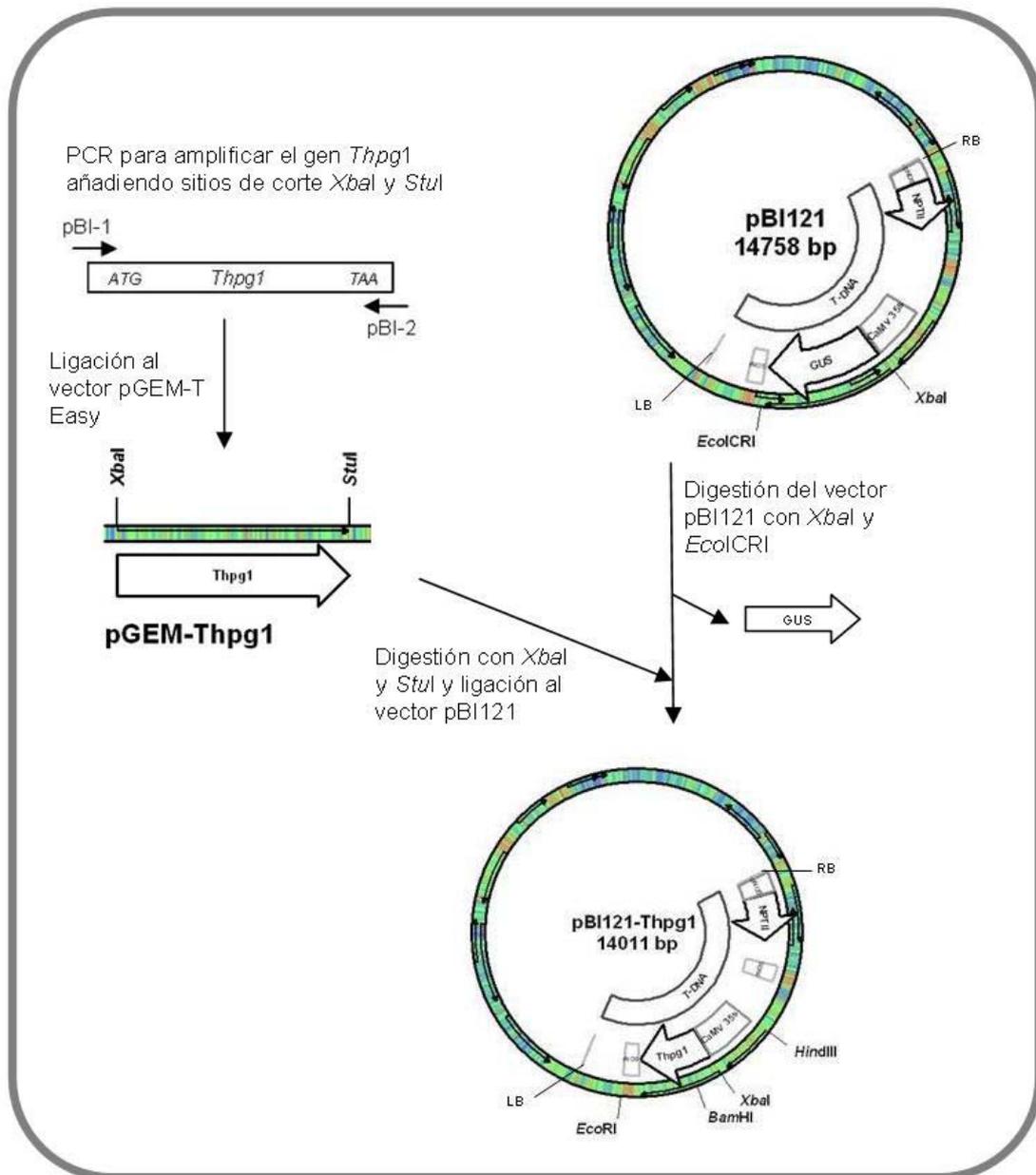


Figura 13. Esquema de la construcción del plásmido pBI121-*Thpg1*. *Amp*: gen de resistencia a ampicilina; *NPTII*: gen de resistencia a kanamicina; *pNOS*: promotor del gen de la nopalina sintasa, *nos*; *tNOS*: terminador del gen *nos*; *CaMV 35S*: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *LB*: *Left Border*; *RB*: *Right Border*. Para más detalles, consultar el texto.

7. TRANSFORMACIÓN DE ORGANISMOS

7.1. Transformación de bacterias

7.1.1. *E. coli*

7.1.1.1. 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 agar LB de *E. coli* DH5 α y se incubó a 37°C durante 16 h.
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 h, 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 5000 x g 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 del 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; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM. Se ajustó el pH a 6,7 con KOH, se añadió MnCl₂, se filtró a esterilidad y se conservó a 4°C.

7.1.1.2. Transformación

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

1. Las células competentes se descongelaron lentamente en hielo.
2. Se incubaron en hielo 90 μ L de esas células competentes con 1-10 μ L (20-200 ng aproximadamente) del plásmido (individual o de ligación) con que se quiera transformar durante 20 minutos.
3. Se pasaron las células a un baño a 42°C durante 45 segundos.
4. Se incubaron de nuevo en hielo durante 2 minutos.

5. Se añadió sobre las células 1 mL de medio líquido LB y se incubó a 37°C durante 1 h.
6. Se tomaron alícuotas del cultivo anterior y se extendieron sobre placas Petri con medio sólido LB. Este medio se suplementó con ampicilina (100 µg/mL) si el plásmido era resistente a dicho antibiótico. Cuando el plásmido permitió selección por color, el medio LB se suplementó también con IPTG (25 µM) y X-gal (50 µg/mL).
7. Se incubaron las placas en una estufa a 37°C hasta la aparición de colonias (16-20 h).

7.1.2. *A. tumefaciens*

7.1.2.1. Preparación de células competentes

1. Se realizó una siembra en estría en agar LB de *A. tumefaciens* C58C1 y se incubó a 28°C durante 48 h.
2. A partir de esta placa inicial se preparó un cultivo saturado en 10 mL de LB suplementado con rifampicina (0,14 mg/mL), que se incubó a 28°C durante 2-3 días.
3. Con 1 mL de este cultivo se inoculó un matraz de 500 mL con 100 mL de LB y se incubó a 28°C durante 20-24 h, hasta obtener una D.O. de 0,5-1,0 unidades a 600 nm.
4. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos y 4°C.
5. El precipitado se lavó dos veces con agua ultrapura estéril a 4°C.
6. Finalmente las células se resuspendieron en 4 mL de glicerol al 10% y se hicieron alícuotas que se mantuvieron a -80°C.

7.1.2.2. Transformación

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* C58C1 se realizó mediante electroporación siguiendo el método de Dower y col. (1988).

1. Las células competentes se descongelaron lentamente en hielo. A 30 µL de células se añadieron 0,1-0,5 µg de plásmido y se mezcló suavemente.
2. La suspensión se añadió a cubetas de electroporación (Bio-Rad) de 0,1 cm previamente enfriadas.
3. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador (Bio-Rad) en las siguientes condiciones: 1,2 kV, 1 kΩ y 25 µF.
4. Inmediatamente después del pulso se añadió 1 mL de medio SOC y se incubaron las células a 28°C y 200 rpm durante 3 h.
5. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL).

7.2. Transformación de hongos filamentosos

La transformación de *T. harzianum* T34 se realizó mediante protoplastos, siguiendo el método descrito por Penttilä y col. (1987) y optimizado por Cardoza y col. (2006b). El gen *ble* se empleó como marcador de selección de los transformantes.

7.2.1. Preparación de protoplastos

1. A partir de un stock de esporas en glicerol de *T. harzianum* T34, se sembraron placas de PDA y se incubaron a 28°C durante 5-6 días. Pasado este tiempo, se recogieron las esporas (apartado 4.1.1.) y se inocularon 100 mL de medio CM con aproximadamente 5×10^8 esporas totales.
2. Una vez inoculado, el matraz se incubó a 28°C y 250 rpm durante 13-14 h. En estas condiciones se consigue que el micelio crezca de forma laxa y con poca tendencia a la formación de precipitados.
3. El micelio se filtró a través de nylon estéril de 30 μm de diámetro de poro (nytal, Maissa) y se lavó con 100 mL de NaCl al 0,9% (p/v) y con 100 mL de TLA. Una vez filtrado, se retiró el exceso de humedad sin secarlo por completo. A partir de este momento, se trabajó con 0,5 g de micelio.
4. El micelio se resuspendió en 50 mL de TPA conteniendo DTT 25 mM (preparado en el momento), y se mantuvo a 30°C y 250 rpm durante 2 h.
5. Después del tratamiento con DTT, los 50 mL se centrifugaron a 3600 x g durante 10 minutos. Para eliminar los restos de DTT, se lavó el precipitado con 50 mL de TPA y se centrifugó de nuevo a 3600 x g durante 10 minutos.
6. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 20 mL de TPA, conteniendo enzima lítica a una concentración final de 5 mg/mL y filtrado a esterilidad (*Lysing Enzymes*, Sigma).
7. La preparación resultante se pasó a un matraz y se incubó a 30°C y 80 rpm durante aproximadamente 2-3 h, controlando cada hora la formación de protoplastos al microscopio.
8. Una vez obtenidos los protoplastos, éstos se recogieron por filtración a través de nylon de 30 μm de diámetro de poro. Los restos de micelio quedan retenidos y los protoplastos pasan a través del nylon, diluyéndose posteriormente 1:5 en solución ST.
9. La suspensión se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos para sedimentar los protoplastos, y a continuación se lavaron una vez con solución ST.
10. Los protoplastos se resuspendieron en, aproximadamente, 450 μL de solución STC, se pasaron a hielo y se contaron al microscopio en una cámara Thoma. La concentración de la solución se ajustó a 10^7 - 10^8 protoplastos/mL.
11. Finalmente, se añadió a la solución de protoplastos 1/10 del volumen de solución PTC.

TLA: tampón fosfato sódico 10 mM; MgSO₄ 0,6 M, pH 5,8. Se esterilizó en autoclave.

TPA: tampón fosfato sódico 10 mM; MgSO₄ 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; CaCl₂ 20 mM. Se esterilizó por filtración.

Solución PTC: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; CaCl₂ 20 mM; PEG 6000 al 60%. Se esterilizó por filtración.

7.2.2. Transformación

1. Se mezclaron, en hielo, de 2 a 5 µg de ADN con 200 µL de la solución de protoplastos (conteniendo una concentración entre 10⁷-10⁸ protoplastos/mL). Los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 minutos.
2. Se añadió 1 mL de solución PTC y los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. Se añadieron 1,2 mL de solución STC para diluir los protoplastos. Se mezclaron bien y se sembraron alícuotas de 300 µL en 7 mL de agar de cobertura (TSA-top) sobre placas de medio selectivo (TSA).
4. Las placas se dejaron solidificar unos 5 minutos y se incubaron a 30°C hasta que aparecieron las colonias (5-7 días).

7.3. Transformación de plantas de *A. thaliana*

La transformación de *A. thaliana* por medio de *A. tumefaciens* se realizó por el método de infiltración *in planta* (Clough y Bent, 1998).

7.3.1. Transformación

1. Se preparó un cultivo saturado de *A. tumefaciens* para inocular 200 mL de medio LB (3:200) que se incubó a 28°C durante 24 h.
2. Las células se recogieron por centrifugación (3000 rpm, 15 minutos a 4°C) y se resuspendieron en 400 mL de solución de infiltración.
3. Plantas de *A. thaliana* Col-0 se cultivaron en macetas (6 macetas con 10-15 semillas cada una), en las condiciones descritas en el apartado 4.2.3., durante 6 semanas. Siete días antes de proceder a la transformación, se podaron las inflorescencias primarias para estimular la producción de inflorescencias secundarias.
4. Las plantas se introdujeron en la solución de infiltración, de modo que la parte aérea de la planta quedara sumergida en la suspensión celular durante 2 minutos.
5. Después de la infiltración, las plantas se mantuvieron en un fitotrón, en las condiciones mencionadas en el apartado 4.2.3., durante 2-3 días, cubiertas con plásticos para evitar la pérdida de humedad y favorecer su recuperación.

7.3.2. Selección de semillas transgénicas.

Las plantas infiltradas (T0) se incubaron en un fitotrón hasta la producción de semillas. Estas semillas se recolectaron y se secaron a temperatura ambiente durante 2-5 días. Tras esterilizar su superficie, se eliminó la dormición por estratificación durante 48 h a 4 °C y se sembraron en placas con medio MS suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Para evitar contaminaciones con *Agrobacterium*, se añadió cefotaxima (250 µg/mL). Estas placas se incubaron a 22°C, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y una humedad del 70%. Las semillas germinadas se dejaron crecer hasta que emergieron las hojas primarias (10 días). En este momento se pudo diferenciar entre las semillas resistentes a kanamicina (generación T1) y las no resistentes (semillas no transformadas), ya que las primeras eran capaces de germinar y formar plántulas perfectamente desarrolladas. Tras sucesivas rondas de selección en kanamicina, se obtuvieron las plantas de la tercera generación (T3) (Figura 14).

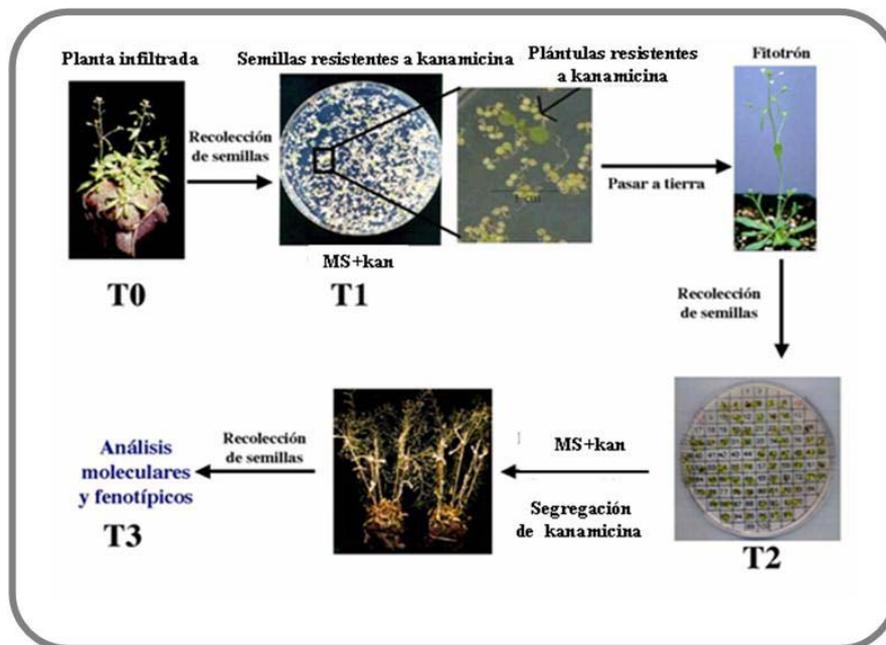


Figura 14. Esquema de la obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Para más detalles consultar el texto.

8. MANIPULACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

8.1. Preparación de bacterias para la transducción

1. Se inocularon 50 mL de LB, conteniendo MgSO_4 10 mM y maltosa al 0,2%, con 1-2 colonias de la cepa *E. coli* LE392. Este cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,5 a 0,7 unidades.
2. Se recogieron las células por centrifugación a 500 x g durante 15 minutos.
3. Se resuspendieron en la mitad del volumen inicial con MgSO_4 10 mM y se conservaron a 4°C. Las células así preparadas son viables durante 1-2 semanas.

8.2. Infección de células con el bacteriófago lambda

1. Se infectaron 200 μL de la suspensión de células (para placas de 9 cm de diámetro) o 600 μL (para placas de 15 cm de diámetro) con 1-10 μL de la dilución apropiada de fagos en medio SM.
2. Se incubaron a 37°C durante 15 minutos.
3. Se añadieron las células infectadas sobre 3 mL (para placas de 9 cm) o 7 mL (para placas de 15 cm) de medio NZY de cobertera precalentado a 48°C, se mezcló por inversión y se extendió inmediatamente sobre placas con medio NZY sólido.
4. Las placas se incubaron a 37°C hasta que aparecieron zonas de lisis (unas 10-12 h).

8.3. Aislamiento de calvas de lisis de fagos en medio sólido

1. Se recogió la zona de lisis formada por el fago de interés con la parte trasera de una pipeta *Pasteur* estéril, y se introdujo en un tubo con 500 μL de medio SM y 1 μL de cloroformo.
2. Se agitó vigorosamente y se mantuvo a 4°C durante 2-4 h para permitir la difusión del fago.

8.4. Amplificación de fagos en medio sólido

1. Se preparó una infección con un título de fagos tal que se obtuvieran placas con zonas de lisis casi confluentes. Se dejaron crecer las células tal y como se describe en el apartado 6.2.
2. Se añadieron 5 mL de medio SM sobre cada placa y se incubaron a 4°C con agitación suave toda la noche con el fin de permitir la difusión del fago.
3. El medio SM se recogió en un tubo. Se lavaron las placas con 1 mL de medio SM adicional y se añadió al tubo inicial. Este lisado se puede emplear como

molde para una PCR de cadena larga. Sin embargo, cuando se pretende extraer el ADN del fago se continúa con los siguientes pasos.

4. Se recogió la cobertura raspando con una espátula y se adicionó al lisado. Se añadió cloroformo hasta una concentración del 2%, se mezcló y centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos, a 4°C. Se recogió el sobrenadante eliminando así la agarosa residual.
5. Se procedió a la extracción del ADN del fago (apartado 9.1.2).

9. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

9.1. Extracción de ADN

9.1.1. Extracción de ADN plasmídico de bacterias

9.1.1.1. Minipreparaciones (*boiling minipreps*)

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

1. Se inocularon 3 mL de medio LB con una colonia de bacterias suplementado con ampicilina (100 µg/mL).
2. Se incubó a 37°C y 200 rpm durante 16 h.
3. Se recogieron las células contenidas en 700 µL del cultivo por centrifugación a 13000 x g durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante.
4. Se añadieron 110 µL de tampón STET-L, y se resuspendieron las células.
5. Las muestras se hirvieron durante 30 segundos, y posteriormente se centrifugaron a 13000 x g durante 10 minutos.
6. Se retiró el precipitado con un palillo estéril impregnado de una solución de RNAsa (Ribonucleasa A, Sigma) 10 mg/mL.
7. El ADN plasmídico se precipitó añadiendo 100 µL de isopropanol. Se mantuvo a -20°C durante al menos 15 minutos.
8. Se centrifugó a 13000 x g durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante.
9. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) (centrifugando a 13000 x g durante 5 minutos), se dejó secar y, finalmente, se resuspendió el ADN en 20-25 µL de agua estéril o tampón TE.

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

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

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

9.1.1.2. Lisis alcalina a pequeña escala

Este método se utilizó en el caso de necesitar ADN de mayor calidad (por ejemplo, para la secuenciación automática). Se utilizó el *kit* comercial “*Mini Plasmid Prep UltraClean*” (MoBio), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este método consiste en una lisis alcalina de las células seguida de la purificación del ADN por afinidad a una resina.

9.1.1.3. Lisis alcalina a gran escala

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

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

9.1.2. Extracción de ADN del bacteriófago lambda

Se empleó el *kit* comercial “*Qiagen Lambda Midi*” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas pequeñas modificaciones, que se detallan a continuación. Antes de comenzar se prepararon infecciones con un título de fagos adecuado tal y como se indica en el apartado 8.4. Se partió del lisado de, al menos, 8 placas (de 9 cm) por fago para llevar a cabo la extracción. Se partió de un volumen de lisado de aproximadamente 50 mL siguiendo el protocolo de extracción para este volumen. Este método consiste en una lisis alcalina de las células, seguida de una purificación del ADN basada en la afinidad a una resina de intercambio aniónico, en condiciones adecuadas de pH y concentración salina.

☞ Una vez añadido el tampón L2, se obtiene un mejor rendimiento si se deja toda la noche.

9.1.3. Extracción de ADN genómico de *Trichoderma*

9.1.3.1. Extracción a pequeña escala

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

1. Se pulverizó el micelio liofilizado en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Se recogieron aproximadamente 40 mg de micelio pulverizado en un tubo *ependorf*, se añadieron 500 μ L de tampón de lisis y se homogeneizó utilizando una punta de pipeta cortada.
3. A continuación, se añadieron 250 μ L de fenol saturado con TE y 250 μ L de CIA (24:1).
4. Se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 13000 x g durante 50 minutos a 4°C.
5. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo, se añadieron 10 μ L de una solución 10 mg/mL de RNasa y se incubó a 37°C durante 30 minutos, con objeto de eliminar el ARN.
6. Pasado este tiempo, se añadió un volumen de CIA (24:1). Se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 13000 x g durante 10 minutos a 4°C.
7. De nuevo, la fase acuosa superior se transfirió a otro tubo para proceder a la precipitación del ADN. Se añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, y se mantuvo a -20°C durante al menos 2 h.
8. La muestra se centrifugó a 13000 x g durante 10 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante.
9. El precipitado se lavó con etanol al 70% con objeto de eliminar las sales, y se centrifugó a temperatura ambiente, retirando de nuevo el sobrenadante.
10. Por último, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 100 μ L de tampón TE.

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

9.1.3.2. Extracción a gran escala

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

1. La extracción se realizó en tubos de 10 mL y se partió de unos 120 mg de micelio, liofilizado y pulverizado previamente. Después se añadieron, por este orden, 2,5 mL de fenol, 2,5 mL de tampón de lisis y 2,5 mL de CIA, y los tubos se agitaron en un vórtex para homogeneizar bien las muestras.
2. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 50°C, agitándolos cada 5 minutos. A continuación se centrifugaron a 1900 x g durante 20 minutos, a temperatura ambiente, y se recogió el sobrenadante, fase acuosa, en tubos limpios.
3. Se hicieron dos extracciones más con fenol-CIA (1/2 volumen de cada uno) y un paso final con un volumen de CIA. Los tubos se centrifugaron siempre a 1900 x g durante 5 minutos y a temperatura ambiente.
4. El ADN se precipitó añadiendo 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 7,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Las muestras se mantuvieron a -20°C durante al menos 2 h.
5. Posteriormente se centrifugaron a 1900 x g durante 20 minutos a 4°C, y se retiró el sobrenadante.
6. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se centrifugó a temperatura ambiente y se retiró, de nuevo, el sobrenadante.
7. Finalmente, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 500 µL de tampón TE.

Tampón de lisis: Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM; SDS al 1 %. El SDS se añadió justo antes de comenzar la extracción.

9.1.4. Extracción de ADN genómico de *A. thaliana*

9.1.4.1. Extracción rápida

La extracción de ADN genómico a pequeña escala se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Doyle (1991) con pequeñas modificaciones, y se empleó para la obtención de ADN adecuado para reacciones de PCR.

1. Se partió de 100 mg de tejido vegetal fresco, que fue congelado en nitrógeno líquido y homogeneizado con la ayuda de una espátula.
2. Se añadió 1 mL de tampón de lisis y se mantuvo en un baño a 65°C durante 20 minutos.
3. Se centrifugó a 11000 x g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante en un tubo de 2 mL limpio.
4. Se añadió un volumen equivalente de CIA y se centrifugó de nuevo.

5. La fase acuosa se recogió en un tubo nuevo y se añadieron 0,5 volúmenes de NaCl 0,5 M y 1,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 11000 x g durante 5 minutos.
6. Se retiró el sobrenadante y se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo, se dejó secar el precipitado al aire y se resuspendió en 50 µL de agua ultrapura estéril.

Tampón de lisis: EDTA 20 mM; Tris-ClH pH 8 100 mM; NaCl 1,4 M; CTAB 2%; Na₂SO₃ 1%. Después de esterilizado en autoclave se añadió β-mercaptoetanol al 0,2%.

9.1.4.2. Extracción a gran escala

Este protocolo se utilizó para la extracción de grandes cantidades de ADN que posteriormente se usaron en hibridaciones tipo *Southern*. Se utilizó el *kit* comercial “*DNeasy Plant Mini*” (Qiagen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

9.2. Extracción de ARN

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

9.2.1. Método del TRI Reagent[®]

Para llevar a cabo la extracción de ARN total se utilizó el método del TRI Reagent[®] (Molecular Research Center), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de aproximadamente 30 mg de micelio de *Trichoderma* o 100 mg de tejido vegetal fresco de *A. thaliana* o tomate, liofilizados y pulverizados en mortero en presencia de nitrógeno líquido.

9.2.2. ARN para *microarrays*

Para la obtención de ARN de *A. thaliana* en los ensayos de *microarrays* se utilizó el *kit* comercial “*RNeasy Plant Mini*” (Qiagen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

10. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

10.1. Cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos

10.1.1. En ensayos generales

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

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

10.1.2. En microarrays

El análisis de las muestras de ARN total de *A. thaliana* se llevó a cabo en un equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema está basado en una electroforesis convencional pero desarrollada sobre un chip. Las moléculas fluorescentes (Cy-5) son intercaladas entre las moléculas de ARN que migran en función de su tamaño. La señal fluorescente emitida es transformada en bandas (similares a las obtenidas en un gel de agarosa) y picos (electroferograma). En el electroferograma se determina el área obtenida para los picos que se corresponden con el ARN 18S y 28S. Con ayuda de un marcador, con una relación concentración/área conocida, se extrapolan los resultados de área obtenidos para las muestras.

10.2. Manipulación enzimática de ácidos nucleicos

10.2.1. Tratamiento enzimático de ADN

10.2.1.1. Digestión

Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Roche Applied Science, Basilea, Suiza). Cada una de ellas tiene unas condiciones óptimas de digestión en cuanto a concentración de sales, temperatura y tiempo de incubación. Como norma general, el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de digestión debido a la alta concentración en glicerol de las

soluciones de almacenamiento, condiciones que incluso podrían inhibir su propia actividad. Asimismo, es conveniente que el ADN esté lo suficientemente diluido y limpio con el fin de no alterar las condiciones de reacción.

1. Se mezclaron en un tubo: 1/10 del volumen total de digestión de tampón de digestión (10X), la cantidad adecuada de ADN resuspendido en agua o en tampón TE, las unidades que se consideren necesarias de enzima y agua destilada estéril hasta completar el volumen de digestión.
2. La mezcla se incubó a la temperatura adecuada (normalmente 37°C) durante 3-7 h.
3. En el caso de digestiones simultáneas con dos enzimas, el tampón utilizado fue aquel en el que ambas enzimas presentaban la máxima actividad. Si las enzimas no eran compatibles, la digestión se llevó a cabo en pasos separados.

10.2.1.2. Generación de extremos romos

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

1. Se resuspendió el ADN en 13 μL de agua y se añadieron 2 μL de tampón Klenow 10X.
2. Se añadió 1 μL de dNTPs 10 mM y 1 unidad del fragmento Klenow.
3. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos y la reacción se paró calentando a 70°C durante 10 minutos.

Tampón Klenow 10X: Tris-HCl 500 mM pH 8; MgCl_2 50 mM; DTT 10 mM.

10.2.1.3. Defosforilación de plásmidos

Las reacciones de defosforilación se realizaron empleando la fosfatasa alcalina *Shrimp* (Roche). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10 μL conteniendo 1 μL de tampón de fosfatasa alcalina 10x, proporcionado con la enzima, 50 ng de ADN cortado y 1 U de fosfatasa alcalina. Se incubó a 37°C durante 10 minutos, y posteriormente la reacción se detuvo calentando a 65°C durante 15 minutos.

Tampón fosfatasa alcalina Roche 10X: Tris-HCl 500 mM; MgCl_2 50 mM; pH 8,5.

10.2.1.4. Ligación

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima ligasa del fago T4 (Roche). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10 μL conteniendo 1 μL de tampón de ligasa 10X, proporcionado con la enzima, 10-40 ng de ADN vector, una cantidad equimolar de ADN inserto y 1 U de ligasa T4. La ligación se incubó

durante 12 h a 4°C para los fragmentos con extremos cohesivos y a 16°C para los fragmentos con extremos romos.

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

10.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

10.3.1. Reacción clásica

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

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos que incluían: 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a la temperatura establecida empíricamente para cada par de oligonucleótidos (hibridación), y, finalmente, un tiempo aproximado de 1 minuto por cada kilobase a amplificar a 72°C (extensión). Tras esos 35 ciclos, la amplificación se completó con una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

10.3.2. Reacción de cadena larga

La amplificación de fragmentos largos de ADN (mayores de 2 kb) se llevó a cabo con el sistema “*Expand Long Template PCR System*” (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema contiene una mezcla de una *Taq* ADN Polimerasa termoestable y *Tgo* ADN polimerasa, con actividad correctora. Además, el sistema contiene tres tampones de reacción, con diferentes cantidades de MgCl₂, que se usaron en función del tamaño del ADN que se deseaba amplificar. La temperatura óptima de extensión, en este caso, fue de 68°C. Estas reacciones se llevaron a cabo en dos pasos: 10 ciclos normales y 20 ciclos en los que se iba aumentando el tiempo de elongación en 20 segundos en cada ciclo.

10.3.3. Reacción con polimerasas de alta fidelidad

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

10.3.4. RT-PCR

Para la síntesis y purificación del ADNc utilizado en los ensayos con *microarrays*, se empleó el *kit* comercial "*One-Cycle cDNA Synthesis*" (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN de partida fue de entre 1 y 15 µg.

Para la síntesis y purificación del ADNc utilizado en otros ensayos, se empleó el *kit* comercial SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

10.3.5. PCR a tiempo real (*Real time-PCR*)

Las reacciones de retrotranscripción de ARN total de *T. harzianum* T34 se llevaron a cabo mediante la enzima TaKaRa Ex *Taq*TM HS (Takara Bio, Inc., Japón) y utilizando el sistema *Smart Cycler*[®] (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE.UU.). El principio de esta técnica consiste en la detección de los productos de PCR mediante la detección de la molécula SYBR Green I que emite fluorescencia al unirse a las moléculas de ADN de doble cadena durante la amplificación. La posterior medida de la intensidad de la fluorescencia emitida nos permite determinar la cantidad de producto de PCR amplificado para esa muestra.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL a la concentración final que se indica:

- 19 µl H₂O desionizada
- 25 µl SYBR Premix Ex *Taq*TM, Takara
- 1 µl oligo *forward* (0.2 µM)
- 1 µl oligo *reverse* (0.2 µM)
- 4 µl ADNc (9 ng) como molde en la reacción

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos que incluían: 15 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a la temperatura establecida empíricamente para cada par de oligonucleótidos (anillamiento), y finalmente, 50 segundos a 72°C (extensión). Se realizó una medida continua de la fluorescencia emitida en un rango de 60-95°C aumentando la temperatura 0,2°C por segundo. Finalmente las muestras se mantuvieron a 4°C.

Se determinaron los *crossin points* (CP) para cada transcrito como modelo matemático. Se define CP como el punto en el que el incremento de la fluorescencia se encuentra por encima del fondo (Pfaffl, 2001). La eficacia de la *Real-time* PCR fue calculada según el protocolo descrito anteriormente (Cardoza y col., 2007; Pfaffl, 2001). El nivel (*ratio*) de expresión relativa de *Thpg1* fue expresado en función del valor obtenido para el gen control de la β -actina, siguiendo la siguiente ecuación (Pfaffl, 2001):

$$\text{ratio} = \frac{\Delta CP_{target}(\text{control-muestra})}{(E_{target})} \frac{(E_{ref})}{\Delta CP_{ref}(\text{control-muestra})}$$

E_{target} representa la eficacia de la *Real-time* PCR para el transcrito del gen de interés. E_{ref} representa la eficacia de la *Real-time* PCR para el transcrito del gen de la β -actina. ΔCP_{target} representa la desviación de CP del control frente a la muestra. ΔCP_{ref} representa la desviación de CP del control frente a la β -actina.

Las condiciones para la PCR se optimizaron ante un gradiente de temperaturas.

10.3.6. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

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

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Utilidad
universal	GTTGTA AACGACGGCCAGT	secuenciación extremos plásmidos
reverso	AGGAAACAGCTATGACCATG	secuenciación extremos plásmidos
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGG	secuenciación extremos plásmidos
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC	secuenciación extremos plásmidos
18S-u	CCGCGAAACTGCGAATGGC	obtención sonda ARNr 18S
18S-r	CTTGTTACGACTTTTACTTCCTC	obtención sonda ARNr 18S
act-1	ATCGGTATGGGTCAGAAGGA	obtención sonda β -actina
act-2	ATGTCAACACGAGCAATGG	obtención sonda β -actina
10663-1	CTCGATCTTAGTGACTTGAATG	secuenciación <i>Thpg1</i>
10663-2	GTTCCGTAGCCGACCACTATGG	secuenciación <i>Thpg1</i>
10663-3	GATGTTCCCTCACCAGACCG	secuenciación <i>Thpg1</i>
10663-4	GCCTGATCCCCATTGTCAAG	secuenciación <i>Thpg1</i>
10663-5	CAATGGACTTACCATCACTGG	secuenciación <i>Thpg1</i>
endop-1	CATGACCAA ACTATCCCTTCTC	obtención sondas <i>Thpg1</i>
endop-2	CTTAACAAGTAGCAACACTTGG	obtención sondas <i>Thpg1</i>
endop-3	CCTCTTCATCCATCACC AACC	obtención sondas <i>Thpg1</i>
endop-4	GCCCGACAGAGTAATACCTG	obtención sondas <i>Thpg1</i>
endop-5	CTTTGGCTTCGTCTTGCCACC	obtención sondas <i>Thpg1</i>
endop-6	CACGGGATATGGTATTCTTATTG	
pSIL-1	ACTAGTCCCTTCATCCATCAC	obtención sondas <i>Thpg1</i> (sitio corte <i>SpeI</i>)
pSIL-2	GGATCCGCCCGACAGAGTAGTA	obtención sondas <i>Thpg1</i> (sitio corte <i>BamHI</i>)
pSIL-3	CTCGAGCCCTTCATCCATCA	obtención sondas <i>Thpg1</i> (sitio corte <i>XhoI</i>)
pSIL-4	AAGCTTGCCCGACAGAGTAGT	obtención sondas <i>Thpg1</i> (sitio corte <i>HindIII</i>)
Pta-p	GATGCACTGCAGTCCACATTG	comprobación construcción pJL43b1- <i>Thpg1</i>
INT-F	GTGCTAATCGTGTTATGCACAG	comprobación construcción pJL43b1- <i>Thpg1</i>
INT-R	CTGTGCATAACACGATTAGCAC	comprobación construcción pJL43b1- <i>Thpg1</i>
Tcbh2	GAGCTCAACCCAAAGGAGGG	comprobación construcción pJL43b1- <i>Thpg1</i>
pBI-1	TCTAGAATGACCAA ACTATCCCTTC TC	obtención sondas <i>Thpg1</i> (sitio corte <i>XbaI</i>)
pBI-2	AGGCCTTTAACAAGTAGCAACTT GG	obtención sondas <i>Thpg1</i> (sitio corte <i>StuI</i>)
pBI-sen	CAGAAGACCAAAGGGCAATT	comprobación construcción pBI121- <i>Thpg1</i>

10.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

10.4.1. Electroforesis de ADN

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

1. Se 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 hasta unos 55-60°C. En este punto, 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 por cm de longitud de la cubeta, incluyendo marcadores de ADN de pesos moleculares conocidos.
6. Se visualizaron las bandas mediante iluminación con luz ultravioleta, y se fotografió el 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).

10.4.2. Electroforesis de ARN

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

10.4.2.1. En condiciones no desnaturalizantes (geles de agarosa)

Para comprobar la calidad de las extracciones de ARN, se hizo una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, tal y como se indica en el apartado anterior para las muestras de ADN. Se consideró que el ARN extraído era de calidad cuando pudieron apreciarse, clara y nítidamente, las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18 y 28S.

10.4.2.2. En condiciones desnaturalizantes (geles de agarosa-formaldehido)

En este tipo de geles de agarosa se añadió formaldehido como agente desnaturalizante para evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN. Se empleó en los experimentos de hibridación tipo *Northern*. El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Para un gel de 300 mL se añadieron 3 g de agarosa a 252,5 mL de agua destilada tratada con DEPC. Se calentó en un microondas hasta que la agarosa se disolvió por completo. Se dejó enfriar hasta 55°C y, seguidamente, se añadieron 30 mL de tampón MOPS 10X y 17,5 mL de formaldehido al 37%. Esta mezcla se volcó sobre una bandeja de electroforesis y se dejó solidificar.
2. El gel, sin las muestras, se corrió a 3 V por cm de longitud de la cubeta en tampón MOPS 1X, mientras se completaba la preparación de las mismas. El objetivo de este paso fue calentar la cubeta y el tampón.
3. Se prepararon las muestras:
 - ARN: 20-40 µg en un volumen máximo de 6,5 µL.
 - MOPS 10X: 3 µL.
 - Formaldehido al 37%: 5,5 µL.
 - Formamida al 100%: 15 µL.
 - Agua tratada con DEPC c.s.p. 30 µL.
4. Se calentaron las muestras a 65°C durante 15 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo durante 3-5 minutos. A continuación se añadieron 5 µL de tampón de carga 6X.
5. Finalmente, las muestras se cargaron en el gel y se aplicó un voltaje aproximado de 3 V por cm de longitud de la cubeta durante 4-5 h.

MOPS 10X: ácido 3-(N-morfolino)-propano-sulfónico (MOPS) 0,2 M; acetato sódico 0,05 M; EDTA 0,01 M. Se ajustó a pH 7,0 con NaOH y se esterilizó por filtración. Esta solución se debe mantener protegida de la luz.

10.5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

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

10.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, utilizando 3 pmoles del oligonucleótido de interés por reacción. Se usaron 400-600 ng de ADN plasmídico (en un volumen de 5 µL de agua destilada estéril) extraído de *E. coli*, tal y como se indica en el apartado

9.1.1.2. La secuenciación directa de productos de PCR se realizó a partir de 100 ng de ADN por kb de longitud del producto; y la secuenciación de ADN del fago lambda a partir de 750 ng de molde, siempre en un volumen final de 5 μ L.

10.7. *Primer walking*

Para obtener la secuencia completa del gen *Thpg1* estudiado en este trabajo se utilizó la técnica conocida como “*primer walking*” o secuenciación con oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia conocida.

11. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN EN MEMBRANA

11.1. Transferencia de ácidos nucleicos a membranas

11.1.1. Transferencia de ADN de geles de agarosa (*Southern blot*)

Se realizaron digestiones de aproximadamente 10 μ g de ADN genómico tal como se describe en el apartado 10.2.1.1. Los fragmentos originados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, conteniendo bromuro de etidio, aplicando un voltaje bajo (2 V por cm de longitud de la cubeta). Una vez fotografiado, el gel fue sometido al siguiente protocolo:

1. Se trató con HCl 0,25 N durante 15 minutos en agitación moderada, con el fin de fragmentar las moléculas de ADN mayores de 10 kb. A continuación, se lavó varias veces con agua destilada.
2. Se sumergió el gel en la solución de desnaturalización durante 45 minutos, también en agitación moderada. Se lavó posteriormente con agua destilada.
3. Se sumergió en la solución de neutralización durante 45 minutos, también en agitación.
4. Posteriormente, el gel se equilibró en tampón SSC 10X durante 45 minutos, en agitación.
5. La transferencia se llevó a cabo por capilaridad desde el gel a una membrana de nylon, cargada positivamente, HybondTM N⁺ (Amersham). Para ello, el gel se situó sobre un puente de papel de filtro Whatman[®] 3MM que está en contacto con un tanque de tampón SSC 10X, y saturado con el mismo. Sobre el gel se colocaron sucesivamente, la membrana de nylon del tamaño del gel, 2 papeles Whatman 3MM, una pila de papel absorbente y, finalmente, un peso aproximado de 0,5 kg. Es importante la eliminación de las burbujas de aire que se puedan formar al superponer las distintas capas. La transferencia por capilaridad así dispuesta se mantuvo, al menos, durante 12 h.

6. Tras la transferencia, la membrana se pasó a SSC 2X durante 2 minutos. Se dejó secar al aire y se irradió con luz UV en un *Stratalinker* (Stratagene) aplicando 120 mJ durante 30 segundos para fijar los ácidos nucleicos a la misma.

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

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

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

11.1.2. Transferencia de ARN de geles de agarosa (*Northern blot*)

El ARN se sometió a electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes (apartado 10.4.2.2). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó en agua durante 5-10 minutos para eliminar parte del formaldehído, y seguidamente se equilibró en tampón SSC 10X durante 30 minutos, en agitación moderada. La transferencia y la posterior fijación del ARN se realizaron como se describe en el apartado 11.1.1.

11.1.3. Transferencia de ADN de bacteriófagos (escrutinios)

Para transferir el ADN de los fagos de placas de lisis a una membrana:

1. Se depositó una membrana de *nylon*, previamente cortada con el tamaño adecuado, directamente sobre los fagos contenidos en la placa Petri. La membrana se perforó asimétricamente en los bordes con una aguja para poder orientarla a la hora de recuperar de la placa el clon o clones de interés, y se mantuvo así durante 5 minutos. Si fue necesario hacer una réplica, la segunda membrana se mantuvo durante 10 minutos.
2. La membrana se retiró cuidadosamente de la placa (que se conservó a 4°C) y se trató con solución de desnaturalización, seguidamente con solución de neutralización y, finalmente, con tampón SSC 2X. Estos pasos se realizaron depositando la membrana (con la cara que estuvo en contacto con los fagos hacia arriba) sobre papel de filtro empapado con la solución correspondiente, durante 5 minutos.
3. La membrana se dejó secar al aire, y se fijó en un *Stratalinker* tal y como se indica en el apartado 11.1.1.

11.2. Marcaje de las sondas

11.2.1. Marcaje radiactivo de ADN

Para este tipo de marcaje se usaron dCTPs marcados con ^{32}P . El método seguido para incorporarlos a la sonda fue el de cebadores al azar (*random priming*), utilizando el

kit de marcaje “*Ready to go DNA labelling beads*” (Amersham), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

La sonda marcada se purificó en columnas “*MicroSpin™ S-400-HR*” (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante, con objeto de eliminar los oligonucleótidos no incorporados a la misma.

11.2.2. Marcaje no radiactivo de ADN

Para este marcaje se utilizaron dCTPs con digoxigenina unida. Para incorporar estos dCTPs, se utilizó una reacción de PCR y se incluyó, en la mezcla de reacción, 1/10 del volumen de nucleótidos marcados del kit “*PCR Dig Labeling Mix*” (Roche).

El producto de la reacción de marcaje no radiactivo fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y purificado a partir del gel, empleando el método indicado en el apartado 10.5.

11.2.3. Marcaje de ADNc con uracilo biotinilado

Para el marcaje del ADNc y posterior purificación del ARNc, se empleó el kit comercial, “*IVT*” (Affymetrix), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para favorecer la hibridación y reducir las estructuras secundarias, el ARNc se fragmentó en productos de 50-100 pb mediante una digestión, tal y como se indica en el apartado 10.2.1.1.

11.3. Prehibridación, hibridación y lavados

11.3.1. Prehibridación

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

11.3.2. Hibridación y lavados

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

11.3.2.1. Hibridación con sondas radiactivas

Las hibridaciones de este tipo se realizaron a 65°C durante, al menos, 12 h en el tampón de hibridación correspondiente, al que se le añadió la sonda desnaturalizada. La desnaturalización se realizó por calentamiento durante 10 minutos a 100°C y, posteriormente, enfriamiento en hielo durante, al menos, 2 minutos.

Pasado este tiempo, se retiró el tampón de hibridación con la sonda y se procedió a hacer los lavados. La membrana se sometió a un lavado a temperatura ambiente durante 1 minuto en tampón fosfato 0,04 M pH 7,2; SDS al 1%, seguido de dos lavados en el mismo tampón a 65°C durante 20 minutos.

Tampón de hibridación para sondas radiactivas: tampón fosfato 0,5 M pH 7,2; SDS al 7%, EDTA 10 mM.

11.3.2.2. Hibridación con sondas no radiactivas

Estas hibridaciones se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado anterior pero empleando un tampón de hibridación de composición diferente.

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

Tampón de hibridación para sondas no radiactivas: 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) y 50 mL de SSC 20X. Se mantuvo la mezcla durante 5-10 minutos a 65°C y se añadieron después 2 g de "*Blocking Reagent*" (Roche). Se calentó y agitó la mezcla durante 30-45 minutos a 65°C y, posteriormente, se dejó enfriar.

11.3.2.3. Hibridación con sondas no radiactivas (*GeneChip*)

Se utilizó un "*GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array*" (Affymetrix), que fue hibridado con 15 µg de ARNc fragmentado de las distintas muestras. Para llevar a cabo la hibridación, se utilizó el sistema *GeneChip* de Affymetrix siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El sistema se compone de un horno de hibridación (permite realizar la hibridación de un gran número de chips de manera simultánea), una unidad de procesamiento (realiza el proceso de lavado de los chips, junto con la inyección de una solución de estreptavidina y anti-estreptavidina biotinilada, SAPE), y un láser. En la Figura 15 se muestra el proceso completo de hibridación del chip.

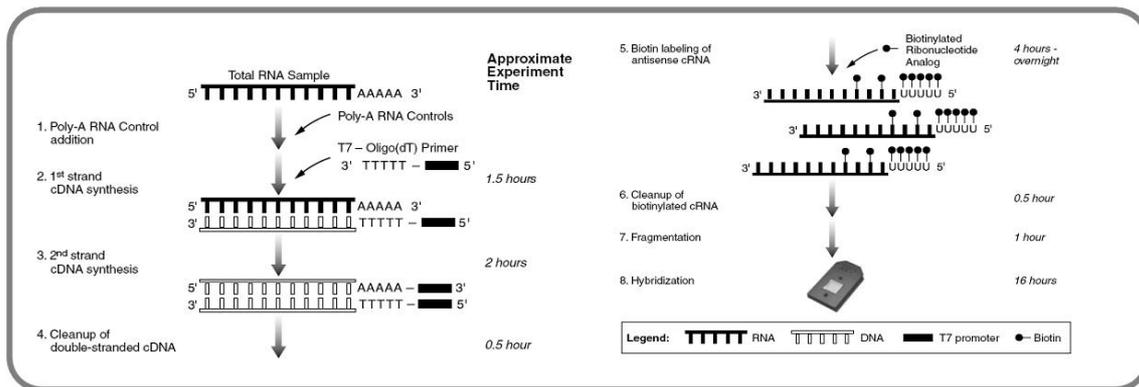


Figura 15. Esquema del proceso de marcate e hibridación del *GeneChip* Arabidopsis ATH1 de Affymetrix.

11.4. Detección

11.4.1. Radiactiva

Tras llevar a cabo los lavados, las membranas se envolvieron en papel de plástico transparente y se expusieron en un *cassette* BAS 2040 (Fujifilm) con pantalla intensificadora *Imaging Plate* BAS-MS 2040 (Fujifilm) durante un tiempo, que se determinó de forma empírica para cada experimento, y la imagen se obtuvo usando un sistema o equipo *Bio-Imaging Analyzer* BAS-1500 (Fujifilm). En caso necesario, para cuantificar la intensidad relativa de las bandas obtenidas en experimentos de tipo Northern se utilizó el programa *ImageGauge* v4.0 (Fuji Photo Film Co., Ltd.).

11.4.2. No radiactiva

La detección no radiactiva se realizó con anticuerpos frente a digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. El revelado de la actividad fosfatasa se llevó a cabo mediante una reacción quimioluminiscente empleando el reactivo *CDP-Star* (Roche). Para ello se siguió, con ligeras modificaciones, el siguiente protocolo que proporciona la casa comercial:

1. Tras llevar a cabo los lavados, se 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 1:100 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 a una película radiográfica (Fujifilm) en un *cassette* EC-DW (Fujifilm) durante 1-15 minutos y se reveló.

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.

11.4.3. No radiactiva (*GeneChip*)

La detección de la fluorescencia emitida por el *chip* se realizó con el sistema *Gene Array reader* (Affymetrix). Los resultados fueron analizados con un paquete informático compuesto por el programa GCOS, que permite digitalizar los datos de fluorescencia generados por el láser, y el programa *Desktop Mining Solution* (Micro DB 3.0, Data Mining Tool 3.0), que permite la identificación de los genes inducidos y/o reprimidos en cada experimento, mediante el uso de las bases de datos generales junto con la base de datos de Affymetrix.

11.5. Reutilización de membranas

11.5.1. Hibridación radiactiva

Con objeto de reutilizarlas, las membranas se limpiaron sumergiéndolas en una solución hirviendo de SDS al 0,2%, y se mantuvieron ahí hasta que la solución se enfrió a temperatura ambiente.

11.5.2. Hibridación no radiactiva

Las membranas se sometieron al siguiente tratamiento para su reutilización:

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

12. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

12.1. Obtención de proteínas intracelulares

12.1.1. Condiciones de cultivo

Para la obtención de proteínas intracelulares de la cepa T34, ésta se creció en condiciones que simulaban una interacción *in vivo* *Trichoderma*-planta-patógeno, tal y como se describe en el apartado 4.1.6.

12.3.2. Concentración y diálisis de las muestras

La obtención de proteínas intracelulares se realizó siguiendo el método descrito por Gorg y col. (2000), con ligeras modificaciones:

1. Se partió de aproximadamente 1 g de micelio de *Trichoderma* (obtenido como se describe en el apartado 4.1.6), que se pulverizó en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. El micelio se resuspendió en 10 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v) en acetona fría conteniendo ditiotreitól (DTT) al 0,2%.
2. Las muestras se homogeneizaron con ayuda de una micropipeta y por agitación en vórtex. Posteriormente, se mantuvieron a -20 °C durante, al menos, 45 minutos, para que las proteínas precipitasen.
3. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 15000 x g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 1,5 mL de acetona fría conteniendo DTT al 0,2%.
4. Las proteínas se dejaron precipitar de nuevo a -20 °C durante, al menos, 1 h.
5. Las muestras se centrifugaron a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C, y el precipitado se dejó secar al aire, resuspendiéndolo después en 1,5 mL de solución RHS.
6. Finalmente, las proteínas se mantuvieron a temperatura ambiente, durante 2 h, y en agitación para ayudar a su completa resuspensión. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 20000 x g durante 30 minutos a 20°C, y los sobrenadantes obtenidos se conservaron hasta su uso a -20 ó -80°C.

Solución RHS: urea 9M; CHAPS 2% (p/v); DTT 1% (p/v); fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) 10mM (Sigma).

☞ Este protocolo se utilizó para la obtención de proteínas intracelulares que posteriormente se visualizarían en geles 2D SDS-PAGE.

12.2. Obtención de proteínas intracelulares de *A. thaliana*

Para la obtención de proteínas intracelulares de *A. thaliana*, se resuspendió 1 g de material vegetal liofilizado, en tampón fosfato 50 mM pH 5,5 y se agitó en vortex a 4°C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12000 x g a 4°C y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su uso.

12.3. Obtención de proteínas extracelulares

12.3.1. Condiciones de cultivo

Para el estudio de la actividad endopoligalacturonasa en *T. harzianum* se empleó un sistema en cultivo en dos fases similar al utilizado para los estudios de expresión, descrito en el apartado 4.1.4. Las condiciones de cultivo seleccionadas fueron aquellas en las que se detectó expresión del gen *Thpg1*.

12.3.2. Concentración y diálisis de los sobrenadantes

Los sobrenadantes de cultivos de *Trichoderma* se pasaron a través de un filtro de 0,22 µm y, a continuación, se concentraron hasta un volumen de 40-50 mL mediante un Sistema de Ultrafiltración Minitan (Millipore), empleando una membrana con un tamaño de poro de 10 kDa y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes concentrados se dializaron utilizando membranas de diálisis (Sigma), preparadas de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. La diálisis se mantuvo a 4°C durante, al menos, 48 h, con cambios de agua destilada cada 6-8 h.

12.4. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína en solución se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) y siguiendo el procedimiento de microensayo recomendado (para 1-20 µg proteína/mL). Se utilizaron 800 µL de la muestra convenientemente diluida en agua y se añadieron 200 µL del reactivo. Las muestras se incubaron a 37°C durante 15 minutos y se midió la densidad óptica a 595 nm. La cantidad de proteína se determinó por extrapolación sobre una recta patrón realizada simultáneamente con diluciones seriadas de seroalbúmina bovina (Sigma) de concentración conocida en el rango de 1-20 µg/mL.

12.5. Ensayos de actividad endopoligalacturonasa

12.5.1. En medio sólido

Se realizó un primer ensayo para determinar la actividad de la proteína ThPG1, mediante un ensayo en medio sólido. Para ello, se utilizó un sobrenadante concentrado

200 veces, tal y como se describe en el apartado 12.2.2., de la condición en la que se detectó mayor expresión, en MM suplementado con pectina al 0,5% durante 24 h. El ensayo se realizó en placas de tampón acetato sódico 100 mM pH 5,5, con ácido poligalacturónico al 0,5% y agarosa al 1%. Se añadieron 50 μ L del sobrenadante concentrado a un cilindro metálico con un diámetro de 0,7 cm colocado sobre la placa. Se incubó a 37° C durante 36 h. Transcurrido este tiempo la placa se reveló con HCl 6 N durante 5 minutos en agitación suave.

12.5.2. En medio líquido

Para determinar la actividad endopoligalacturonasa en las muestras seleccionadas se utilizó el método de Somogyi (1952) de determinación de azúcares reductores. En un tubo se añadieron 150 μ L de la solución problema y 150 μ L de la solución Somogyi (Somogyi I: Somogyi II en proporción 4:1). La mezcla se hirvió durante 10 min y posteriormente se pasaron los tubos a un baño de hielo. Se añadieron 150 μ L del reactivo de Nelson y se agitaron vigorosamente el tiempo necesario para eliminar el CO₂ emergente. Las muestras se diluyeron hasta un volumen de 1 mL con agua ultrapura y se midió la absorbancia a 520 nm.

Para cuantificar los azúcares reductores en la solución problema se llevó a cabo en paralelo una reacción de Somogyi-Nelson para disoluciones de glucosa de concentraciones conocidas en el rango comprendido entre 0 y 400 μ g/mL. Con los resultados obtenidos para las muestras de glucosa de concentración conocida, se hizo una recta patrón sobre la que se extrapolaron los resultados obtenidos para las muestras problemas.

☛ La solución problema se preparó con 50 μ L de sobrenadante y 100 μ L de tampón acetato 50 mM pH 5,5 con PGA al 0,2%. Para comprobar si los sobrenadantes habían sido correctamente dializados, no se añadió el PGA al tampón acetato en sus controles, y se utilizó como blanco una solución de tampón acetato con PGA al 0,2%.

Reactivo de Somogyi I: 15 g de tartrato potásico, 30 g de Na₂CO₃ y 20 g de NaHCO₃ en 300 mL de agua desionizada. La solución resultante se añadió sobre una solución de 180 g de NaSO₄ 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 CuSO₄·5H₂O y 18 g de NaSO₄ en 100 mL de agua desionizada. El reactivo se conservó a temperatura ambiente.

Reactivo de Nelson: se disolvieron 12,5 g de (NH₄⁺)₂MoO₄·4H₂O en 225 mL de agua desionizada y se mantuvo en agitación mientras se añadían 10 mL de H₂SO₄ concentrado. Por otro lado se preparó una segunda solución de 1,5 g de NaAsO₃ en 12,5 mL de agua destilada. Ambas soluciones se mezclaron y se mantuvo la mezcla a 37°C durante 48 h. El reactivo se conservó a temperatura ambiente en un frasco topacio, para protegerlo de la luz.

12.6. Técnicas electroforéticas: Electroforesis unidimensional de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La separación de proteínas mediante electroforesis unidimensional en condiciones desnaturizantes (Weber y Osborn, 1975) se llevó a cabo con un sistema vertical de minigeles Mini-Protean II (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones de la firma comercial. Los geles de separación se prepararon a una concentración final de acrilamida del 12% (v/v), y los de empaquetamiento a una concentración de acrilamida del 4%. La polimerización de los geles se realizó a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio dispuestas para obtener geles de 0,75 mm de grosor. Las muestras de proteínas se prepararon en un volumen final de 30 μ L a una dilución 3:1 en tampón de carga y se precalentaron a 55°C durante 5 minutos para evitar la desnaturización irreversible de las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis aplicando una corriente de 150 V y 70 mA hasta que el colorante alcanzó la parte inferior de la placa (1 h aproximadamente). Como marcadores de peso molecular se utilizaron proteínas de bajo peso molecular (Bio-Rad): beta-galactosidasa (116,3 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina de gallina (45 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31 kDa), inhibidor de tripsinógeno de semilla de soja (21,5 kDa) y lisozima de huevo de gallina (14,4 kDa).

Gel de separación: 3,35 mL de agua ultrapura; 2,50 mL de Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; 100 μ L de SDS al 10%; 4 mL de solución de acrilamida-bis:acrilamida (29:1); 50 μ L de APS al 10% (p/v); 10 μ L de TEMED (Bio-Rad).

Gel de empaquetamiento: 3,05 mL de agua ultrapura; 1,25 mL de Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; 50 μ L de SDS al 10%; 0,65 mL de solución de acrilamida-bis:acrilamida (29:1); 25 μ L de APS al 10%; 5 μ L de TEMED.

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

Tampón de electroforesis: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS al 0,1%.

12.6.1. Determinación de la actividad endopoligalacturonasa en geles de acrilamida

El gel resultante tras la separación electroforética de las proteínas se lavó en tampón de renaturalización a 4°C durante 1 h con agitación suave y cambios de tampón cada 30 minutos. Posteriormente, se lavó en tampón acetato 50 mM pH 5,5 a temperatura ambiente durante 5 minutos. Paralelamente, se preparó un gel de agarosa al 1% (p/v) que contenía PGA al 0,5% (p/v). La solidificación del gel se realizó a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio dispuestas para obtener geles de 1,5 mm de grosor. Los geles de agarosa y acrilamida se colocaron uno sobre otro, y se incubaron a 37°C durante 2 h y 30 minutos. A continuación, se separaron ambos geles, y el gel de agarosa se tiñó, durante 2 h, con una solución de Rojo Rutenio al 0,02% (p/v). Transcurrido este tiempo, se equilibró mediante un lavado de 10 minutos en una solución de NaCl 1 M y, finalmente, se mantuvo en tampón acetato 50 mM pH 5,5

(Soler y col., 1999). La actividad endopoligalacturonasa se observó como bandas de color blanco en el gel de acrilamida.

Tampón de renaturalización: Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, EDTA 2 mM y caseína al 1% (p/v).

12.7. Técnicas electroforéticas: Electroforesis bidimensional de proteínas en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE)

12.7.1. Primera dimensión (isoelectroenfoque, IEE)

Las proteínas intracelulares obtenidas tal y como se describe en el apartado 12.1., se separaron utilizando un sistema de isoelectroenfoque en un equipo PROTEAN IEF *Cell system* (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EE.UU.). Se aplicaron 400 µg de proteínas totales (200 µL de la solución) a lo largo de un *cassette* de rehidratación, y se puso en contacto con unas tiras de isoelectroenfoque de 11 cm (IPG strips, Bio-Rad) con un gradiente lineal inmovilizado de pH de 3-10, que fueron rehidratadas con una solución de rehidratación (Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente y 12 h aplicando una corriente de 50 V. Tras este paso se aplicaron las siguientes condiciones de IEE: 300 V durante 1 h, 8000 V durante 3 h y 8000 V hasta completar 34000 V/h.

Solución de rehidratación: urea 9 M, CHAPS al 2%, DTT al 1%, anfolitos al 2% y fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) 10mM (Sigma).

12.7.2. Equilibrado de las tiras

Para eliminar el exceso de DTT que pudiera interferir en la separación que tiene lugar en la segunda dimensión, las tiras se equilibraron con lavados consecutivos de 10 minutos y en agitación, en las soluciones de equilibrado I y II.

Solución de equilibrado I: urea 6 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8,8; glicerol al 20%; SDS al 2%; DTT al 2%.

Solución de equilibrado II: urea 6 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8,8; glicerol al 20%; SDS al 2%; iodoacetamida al 2,5% (p/v).

12.7.3. Segunda dimensión

La separación de proteínas en la segunda dimensión (SDS-PAGE) se llevó a cabo con un sistema vertical de geles Protean II xi 2-D Cell (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los geles de separación se prepararon a una concentración final de acrilamida del 12%. La polimerización de los mismos se realizó a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio dispuestas para obtener geles de 1,5 mm de grosor. Las tiras de la primera dimensión se situaron en la parte superior de los geles polimerizados con ayuda

de una solución de agarosa que favoreció el contacto entre la tira y el gel, evitando la formación de burbujas. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis aplicando una corriente constante de 80 V durante 12 h. Como marcadores de peso molecular se utilizaron proteínas de amplio rango de pesos moleculares (Bio-Rad).

Geles de separación: para preparar 6 geles se mezclan 156,44 mL de agua ultrapura; 89,91 mL de Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; 4 mL de SDS al 10%; 107,89 mL de solución de acrilamida-bis:acrilamida (29:1); 1,80 mL de APS al 10% y 360 μ L de TEMED.

Solución de agarosa: agarosa al 0,5% y trazas de azul de bromofenol en tampón de electroforesis.

12.7.4. Tratamiento informático de las imágenes

Las imágenes de los geles fueron obtenidas con un escáner GS-800 *Imaging Densitometer* (Bio-Rad) y fueron analizadas mediante el programa informático *PD-Quest*. La intensidad de la señal de cada *spot* fue determinada en unidades de densidad óptica (D.O.), y se normalizó como la suma de las intensidades de todos los *spots* incluidos en el gel estándar. Se consideró un *spot* diferencial cuando la variación de la intensidad de la señal era de, al menos, dos veces.

12.8. Tinción de proteínas en geles de acrilamida: Tinción con azul de Coomassie.

Para la visualización de proteínas después de SDS-PAGE, los geles se mantuvieron en solución de tinte a temperatura ambiente y en agitación durante al menos 2 h. Posteriormente, se destiñeron por lavados repetidos con solución de lavado. Finalmente, se fijaron y conservaron en ácido acético al 7%. Las proteínas se observaron como bandas de color azul en el gel de acrilamida.

Para la determinación del peso molecular de proteínas se tuvo en cuenta que la distancia de migración es inversamente proporcional a su peso molecular. Los valores reales de peso molecular se calcularon gráficamente, representando en abscisas las movilidades relativas de las proteínas patrón respecto al colorante de carga, y en ordenadas el logaritmo decimal de los pesos moleculares.

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

Solución de lavado: ácido acético al 10%; etanol al 45%.

☞ Para la visualización de las proteínas en los geles 2D SDS-PAGE se utilizó una solución comercial, SimplyBlue SafeStain G-250 (Invitrogen, CA, EE.UU.), patentado como Coomassie G-250, siguiendo las instrucciones del fabricante.

12.9. Identificación de proteínas

Los *spots* seleccionados, a los que se les asignó un *Standard Spot Number* (SSP *number*) mediante el programa *PD-Quest*, fueron escindidos del gel y digeridos con tripsina (Talamo y col., 2003). Los péptidos resultantes de la digestión fueron resuspendidos en 10 μL de una solución de ácido acético al 1% y analizados mediante una espectrometría de masas, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight* (MALDI-TOF), utilizando la técnica de identificación por huella peptídica, *Peptide mass fingerprint* (PMF).

12.9.1. Espectrometría de masas

La muestra se embebió en una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) mezclado con solventes orgánicos [10 mg/mL de acetonitrilo (ACN)/ácido trifluoroacético al 0,2% (ATF)]. Se depositó 1 μL de la mezcla en la placa del espectrómetro de masas Voyager-DE Pro MALDI-TOF (Applied Biosystem, Foster City, CA, EE.UU.) que se irradió con un láser a una longitud de onda de 337 nm. Se utilizaron como controles internos los iones de la adrenocorticotropina humana (ACTH) (Sigma) y la angiotensina III humana, con pesos moleculares de 2465,1989 Da y 931,5154 Da, respectivamente.

12.9.2. Identificación por huella peptídica

Los datos de masas obtenidos con la espectrometría se analizaron por comparación con las bases de datos del *National Centre Biotechnology Information* (NCBI), y de la base de *Expressed Sequence Tags* (EST) de *Trichoderma*, Trichobase (Vizcaíno y col., 2006, 2007), mediante el programa Mascot (*Matrix Science*, Londres, UK) (<http://www.matrix-science.com>). Este programa compara los valores teóricos y experimentales de péptidos depositados en bases de datos, sometidos a una digestión virtual, generando una lista de posibles péptidos candidatos que coinciden con el *spot* analizado.

13. ENSAYOS DE CRECIMIENTO Y GERMINACIÓN

13.1. Ensayos con *Trichoderma*

Para determinar como el silenciamiento del gen *Thpg1* podría afectar a la capacidad pectinolítica de la proteína ThPG1, se realizó un ensayo de crecimiento en placa del transformante silenciado, ePG5, junto con la cepa silvestre *T. harzianum* T34, en MM Penttilä sin glucosa y suplementado con pectina al 0,5%. Como control se crecieron las dos cepas en placas de PDA y MM Penttilä sin glucosa. El ensayo fue

realizado por triplicado, incubando las placas a 28°C durante 3-4 días. Se tomaron medidas del diámetro de crecimiento para cada condición de crecimiento ensayada, cada 24 h.

13.2. Ensayos con *A. thaliana*

Para determinar el porcentaje de germinación de semillas de *A. thaliana* (Col-0 y líneas transgénicas), se sembraron en placas de medio MS suplementado con manitol 100 mM y NaCl 50 ó 100 mM. En paralelo, se realizaron siembras en medio MS que se utilizaron como control. Se sembraron 100 semillas por placa y el ensayo se realizó por triplicado.

14. DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS

Para la determinación de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) se siguió el protocolo descrito por Durgbanshi y col. (2005):

- Se partió de 0,5 g de tejido fresco foliar de cada muestra.
- Se añadieron, de forma previa a la extracción, 100 ng de [²H₆]-ABA (preparado según Gómez-Cadenas y col., 2005), 100 ng de di-hidro-jasmónico (DHJA, según se describe en Kristl y col., 2002) y 5 ng de [²H₂]-IAA (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- El tejido se homogenizó con 5 mL de agua destilada con la ayuda de un homogenizador (Ultra-Turrax, IKA-Werke, Staufen, Alemania).
- La muestra resultante se centrifugó a 4000 rpm durante 45 minutos.
- Se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 3.0 utilizando una solución de ácido acético glacial al 15% (v/v).
- La solución resultante se extrajo con 3 mL de éter etílico por evaporación (grado ACS, Scharlau, Barcelona, España) utilizando un concentrador centrífugo a vacío (RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, Francia).
- El residuo seco obtenido se resuspendió en 1 mL de una solución de agua y metanol en proporción 9:1 con la ayuda de un baño de ultrasonidos.
- El extracto resultante se filtró a través de filtros de celulosa regenerada de 0,22 µm de tamaño de poro y se inyectó en un equipo de HPLC (Waters Alliance 2860, Waters Corp., Milford, EE.UU.) acoplado en línea con un espectrómetro de masas en tándem con interfaz de electrospray (Quattro LC, Micromass, Manchester, Reino Unido).

Para la detección de las distintas hormonas vegetales se optimizaron las condiciones de ionización y fragmentación mediante la infusión directa de soluciones patrón (a una concentración de 1-3 ppm cada una). La separación de las fitohormonas se

llevó a cabo mediante cromatografía líquida en fase reversa con una columna de C18 (Kromasil 100 C18 5 μm 100 \times 2.0 mm, Scharlau) utilizando como solventes agua y metanol, ambos con una pureza de grado HPLC y suplementados con ácido acético a una concentración de 0,1%. La detección de las fitohormonas se realizó en modo electrospray negativo (ES⁻) siguiendo las transiciones indicadas en la Tabla 4. La cuantificación se realizó mediante la interpolación, en una curva de calibrado inyectada previamente, de los valores de respuesta hallados en las diferentes muestras.

Tabla 4. Iones precursores y transiciones para cada una de las fitohormonas analizadas.

Compuesto	Ión precursor (m/z)	Transición
ABA	263,0	263,0>153,0
JA	209,0	209,0>59,0
SA	137,1	137,1>93,1

15. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y SOFTWARE UTILIZADO

15.1. Búsqueda de secuencias similares en bases de datos

15.1.1. FASTA

El algoritmo FASTA (Pearson y Lipman, 1988) es una aproximación al algoritmo de Smith-Waterman (1981), que divide la secuencia en palabras solapantes, 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.

Permite diferentes combinaciones entre ácidos nucleicos y proteínas, sean estas las secuencias problema o las bases de datos de secuencias. Nos proporciona un valor, el *Z-score*, que después es convertido en un valor E (*E-value*), como en el caso de BLAST.

Las comparaciones de secuencias usando este algoritmo se llevaron a cabo en el servidor del *European Bioinformatics Institute* (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/fasta3>).

15.1.2. BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) constituye una colección de diferentes programas que permiten distintas combinaciones entre ácidos nucleicos y proteínas, sean estas las secuencias problema o las bases de datos de secuencias. Lleva a

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

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

15.2. 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, tienen prioridad 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).

15.3. 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 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 exportar la secuencia a otros formatos.

La búsqueda de motivos o dominios en la secuencia primaria de la proteína se llevó a cabo en la base de datos de dominios SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*), que se puede consultar en la página *web* <http://smart.embl.de>.

15.4. 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 α , hoja plegada β 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/>.

15.5. 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>.

15.6. 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/SignalP-2.0/>. Por otro lado, el análisis de la secuencia de la proteína mediante la aplicación *Scan Prosite* (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 (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/>.

Para el estudio teórico previo de oligonucleótidos y reacciones de PCR se utilizó la aplicación *PrimerSelect* (Lasergene, DNASTAR Inc.). Una herramienta para predecir la T_m de los oligonucleótidos se encuentra en la web <http://alces.med.umn.edu/rawtm.html>.

15.7. Análisis filogenéticos

El objetivo de un análisis filogenético es caracterizar la evolución. Puede llevarse a cabo por atributos morfológicos de los organismos, o bien, como se ha hecho en los últimos años, siguiendo las mutaciones en el material genético de los organismos.

Para la construcción de árboles filogenéticos se ha utilizado el programa *PAUP* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, v4.0, Sinauer Associates, Sunderland, MA, EE.UU.), usando el método *neighbour-joining* (NJ). En este caso, la distancia entre dos secuencias (la longitud de las ramas) en el árbol final corresponde a la similitud entre dos secuencias.

La estabilidad de las ramas de un árbol filogenético se mide mediante un test *bootstrap* (Felsenstein, 1985), el cual se lleva a cabo construyendo un árbol basado en un subconjunto de las columnas del alineamiento múltiple en el que se basa el árbol original. Este proceso se repite múltiples veces (en nuestro caso, 1000 veces) y nos da el número de veces, en porcentaje, en el que el análisis proporciona el mismo árbol final.

15.8. Análisis estadístico

15.8.1. Datos obtenidos en *microarrays*

Para el cálculo de la señal de expresión por *probset* de cada uno de los *microarrays* se utilizó el algoritmo RMA (*Robust Microarray Analysis*) (Irizarry y col., 2003) que incluye 3 pasos: corrección de *background*, normalización por cuantiles y cálculo sumariado de la señal por *probset* utilizando una mediana pulida. Se utiliza un grupo de sondas (*probeset*) para medir los niveles de expresión de un único gen. Cada grupo de sondas consta, a su vez, de múltiples pares de celdas (*probe cells*), con millones de copias de la misma sonda. Las celdas se organizan en parejas (*probe pairs*) con un *Perfect Match* (PM), secuencia que coincide exactamente con una parte del gen, y un *Mismatch* (MM), secuencia idéntica al PM excepto en el nucleótido central que es reemplazado por su complementario.

Para evitar que la poca variabilidad en la señal de los genes afecte al algoritmo de expresión diferencial, los datos se filtran a través de otro algoritmo, IQR (*intercuartile range*), que muestra solo aquellos genes que muestran más variabilidad.

Para el cálculo de la expresión diferencial significativa se utilizó el algoritmo SAM (Tusher y col., 2001), que permite obtener un determinado número de genes significativos para un determinado umbral de FDR (*False Discovery Rate*) (Benjamini y Hochberg, 1995), que indica el número máximo estimado de falsos positivos que admitimos en la lista de genes estadísticamente significativos.

15.8.2. Datos obtenidos en otros ensayos

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos se sometieron a un análisis de la varianza para comprobar si las diferencias entre las cepas analizadas eran estadísticamente significativas. Para ello se aplicó el test de Fisher PLSD (*Protected Least-Significance Difference*) utilizando el programa *StatView* versión 5.0 (SAS institute Inc., Cary, NC, EE.UU.).

15.9. Herramientas de edición

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

- *pDRAW* (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 DNA y proteínas.
- *Genedoc* (www.psc.edu/biomad/genedoc). Se usó para la edición de los alineamientos.
- *Endnote* (Thompson ISI ResearchSoft, www.endnote.com). Se utilizó para la gestión y edición de la bibliografía.

16. CASAS COMERCIALES

Affymetrix: Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU. (<http://www.affymetrix.com>).

Agilent: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.
(<http://www.chem.agilent.com>).

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

Applied Biosystems: Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.
(www.appliedbiosystems.com).

Bio-Rad: Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU. (www.biorad.com).

Biotools: Biotools B y M Labs, Madrid, España (www.biotools.net).

Cepheid: Cepheid, Sunnyvale, CA, EE.UU. (<http://www.cepheid.com>).

Difco: Difco Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU. (www.difco.com).

Duchefa: Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Holanda (www.duchefa.com).

Eppendorf: Eppendorf, Hamburgo, Alemania (www.eppendorf.com).

Fermentas: Fermentas Life Science, Burlington, Ontario, Canadá.
(www.fermentas.com).

Fujifilm: Fuji Photo Film Europa, Düsseldorf, Alemania (www.fujifilm.es).

Gramoflor: Gramoflor GmbH y Co. KG, Vechta, Alemania (www.gramoflor.de).

Invitrogen: Invitrogen, Groningen, Holanda (www.invitrogen.com).

Isogen: Isogen Life Science, Maarssen, Holanda (www.isogen-lifescience.com).

Maissa: Maissa, Barcelona, España.

Merck: Merck KGaA, Darmstadt, Alemania (www.merck.com).

Millipore: Millipore, Billerica, MA, EE.UU. (www.millipore.com).

MoBio: MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU. (www.mobio.com).

Molecular Research Center: Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, EE.UU.
(www.mrcgene.com).

Promega: Promega, Madison, WI, EE.UU. (www.promega.com).

QBio Gene: QBio Gene, Montreal, Quebec, Canadá (www.qbiogene.com).

Qiagen: Qiagen GmbH, Hilden, Alemania (www.qiagen.com).

Roche: Roche Applied Science, Basilea, Suiza (www.roche.com).

Scharlau: Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España (www.scharlau.com).

Sigma: Sigma-Aldrich Co., San Luis, MO, EE.UU. (www.sigma-aldrich.com).

Stratagene: Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU. (www.stratagene.com).

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

Thermo: Thermo Electron Corporation, Ulm, Alemania (www.thermo.com).

Whatman: Whatman Laboratory Products Inc., Clifton, NJ, EE.UU.
(www.whatman.com).

**Capítulo 1: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DEL GEN *Thpg1* DE *T. harzianum* T34**

RESULTADOS

1. TRABAJO PREVIO

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se engloba dentro del proyecto de genómica funcional *TrichoEST*, financiado por la Unión Europea, cuyo objetivo era la obtención y el estudio de ESTs de diferentes especies del género *Trichoderma* relacionadas con el proceso del biocontrol y, a su vez, que tuvieran un interés agroalimentario o industrial.

La secuenciación del genoma de *T. harzianum* T34 y otras cepas del género *Trichoderma* se abordó mediante la generación y el análisis de ESTs (Rey y col., 2004). Estas ESTs se obtuvieron a partir de genotecas de ADNc que se construyeron cultivando el hongo en diferentes situaciones metabólicas (estrés, micoparasitismo, interacción con plantas, etc.). Actualmente, nuestro grupo dispone de una colección de genotecas de ADNc de distintas cepas, obtenidas en diferentes condiciones de cultivo.

De forma previa a este trabajo, en nuestro grupo se construyeron distintas genotecas de ADNc para el proyecto de genómica funcional *TrichoEST*. Entre ellas se construyó una genoteca “mix” de *T. harzianum* T34 (que se denominó L15). Para la construcción de esta genoteca, la cepa T34 se cultivó en un MM (Penttilä y col., 1987) suplementado con ácido poligalacturónico (PGA) al 0,1%, carboximetilcelulosa (CMC) al 0,1%, pectinas al 0,1%, xilano al 0,1% y glucosa al 0,2%, a 28°C durante 36 horas. Los ADNc obtenidos a partir de los ARNm purificados mediante el sistema de perlas magnéticas unidas a poli-T (*dynabeads*), se clonaron en el vector *Lambda Zap* (Stratagene).

Se eligieron al azar diferentes clones de esta genoteca (L15) y se obtuvo una secuencia parcial de los mismos. Por lo tanto, las secuencias así obtenidas derivan de genes que se expresan en las condiciones en las que se elaboró la genoteca de ADNc. La función hipotética de cada EST o *contig* (grupo de ESTs correspondientes al mismo gen) se dedujo a partir de su similitud con otras secuencias presentes en las bases de datos utilizando diferentes herramientas bioinformáticas.

Uno de estos clones, correspondiente a la EST L15T34P120R10663 (a partir de ahora, EST 10663), se eligió como punto de partida en el trabajo de esta Tesis Doctoral. La elección de esta EST se basó en la similitud que presentaba, en bases de datos, con endoPGs fúngicas, implicadas en la degradación de la pared celular de las plantas, y en el hecho de que la cepa de la que proviene se utiliza como agente de control biológico.

2. AISLAMIENTO DE *Thpg1* A PARTIR DE LA EST 10663

Se disponía de una secuencia de 685 pb de la EST 10663 (entre las posiciones 222 y 1150 en la secuencia del gen, Figura 16). Puesto que faltaban los extremos 5' y 3' del gen *Thpg1*, el primer paso consistió en la obtención de una sonda para realizar el escrutinio de una genoteca de ADN genómico de *T. harzianum* T34 y completar la secuencia.

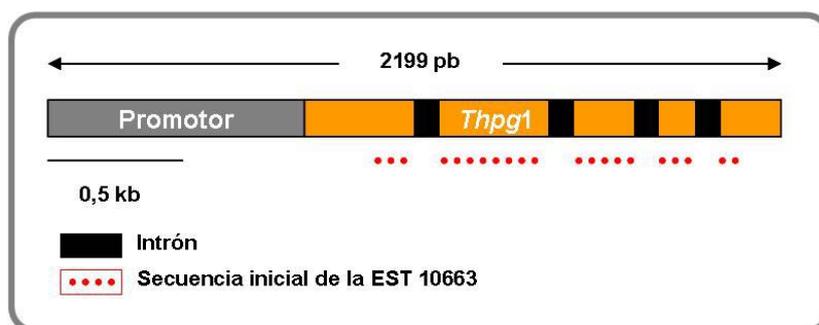


Figura 16. Esquema de la región genómica secuenciada de *Thpg1* de *T. harzianum* T34. Se muestra punteada la posición de la EST 10663 utilizada en el escrutinio de una genoteca de ADN genómico. Se indican también el promotor y los cuatro intrones de *Thpg1*.

Se diseñaron los oligonucleótidos 10663-1 y 10663-2 (Tabla 5, en Materiales y Métodos), sobre los extremos de la secuencia de la EST 10663, y mediante una reacción estándar de PCR, empleando ADN plasmídico de la EST 10663 como molde, estos oligonucleótidos amplificaron un fragmento de 618 pb.

A continuación, se llevó a cabo un escrutinio de la genoteca de ADN genómico de *T. harzianum* T34, L01, (Lora y col., 1995), construida en el vector λ GEM11 (Promega). El producto de PCR de 618 pb, se marcó con digoxigenina y se empleó como sonda para la hibridación de filtros que contenían, aproximadamente, 10000 fagos procedentes de dicha genoteca. Se obtuvieron varios fagos positivos, que se purificaron en dos rondas sucesivas de infección e hibridación. Se seleccionó uno de ellos, el 10663-4-1, y se realizó la extracción de ADN del fago (tal y como se describe en el apartado 9.1.2. de Materiales y Métodos). El ADN del fago obtenido se empleó directamente para secuenciar por *primer walking* los extremos 5' y 3' del gen con los oligonucleótidos 10663-1, 10663-2, 10663-3, 10663-4 y 10663-5 (Tabla 5, en Materiales y Métodos).

En total, se secuenciaron 2199 pb de los cuales 812 pb correspondieron al promotor y 1387 pb correspondieron a la secuencia completa del gen *Thpg1* (Figura 16). Al traducir esta secuencia a aminoácidos se produjo una ruptura en la fase de lectura, y al compararla con las secuencias de otros genes de endoPGs en las bases de datos, se dedujo que contenía al menos un intrón.

3. ANÁLISIS *in silico* DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA

3.1. Identificación de intrones en la secuencia de *Thpg1*

Para identificar los intrones presentes en la secuencia de *Thpg1* se diseñaron los oligonucleótidos endop-1 y endop-2 a partir de los extremos de la secuencia completa del gen. Se utilizaron en una reacción estándar de PCR en la que se usó como molde ADN de fagos amplificados de la genoteca L15, de la que provenía la EST 10663. Para poder comparar los tamaños de las bandas, también se llevó a cabo la misma PCR usando ADN genómico de *T. harzianum* T34 como molde.

En la Figura 17 se muestran los tamaños de ambos productos de PCR. Se puede apreciar que el tamaño de la banda amplificada a partir de la genoteca de ADNc L15 es más pequeño que el de la banda amplificada a partir de ADN genómico, debido a que el ADNc carece de intrones.

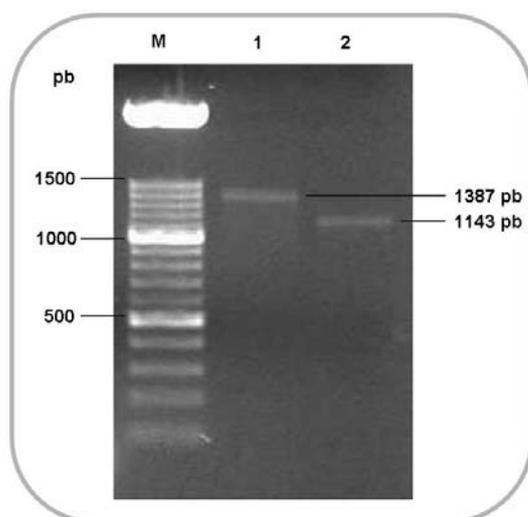


Figura 17. Productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de T34 (carril 1) y ADN de la escisión en masa de la genoteca de ADNc L15 (carril 2), usando los oligonucleótidos endop-1 y endop-2. M: marcador 100 pb DNA ladder XIV (Roche).

El producto de PCR amplificado a partir de ADNc se purificó del gel y se secuenció directamente. Al comparar esta secuencia con la obtenida a partir de los fagos amplificados, se confirmó la presencia de cuatro intrones: intrón 1, 74 pb (256-330), intrón 2, 60 pb (753-813), intrón 3, 55 pb (943-998) e intrón 4, 55 pb (1083-1138). Estos intrones contienen las secuencias consenso típicas en 5' y 3', así como la secuencia de formación del "lazo" (Tabla 5).

Tabla 5. Intrones de *Thpg1*. Las secuencias consenso para hongos filamentosos están tomadas de Ballance (1986). Las bases que no coinciden con el consenso se indican en minúscula.

	Inicio del procesamiento del intrón	Sitio de formación del "lazo"	Fin de procesamiento del intrón
Consenso	GTAHGTY	WRCTRAC	MYAG
Intrón 1	GTtgagTa	TACTGAt	ATAG
Intrón 2	GTAAGTC	AGCTGAg	ATAG
Intrón 3	GTAAGTC	AtCTAgt	ACAG
Intrón 4	GTATGcC	AGCTAtt	ACAG

3.2. Estudio de la secuencia del promotor de *Thpg1*

Se secuenciaron 812 pb del promotor de *Thpg1* con los oligonucleótidos 10663-5, 10663-6 y 10663-7. La secuencia completa de la región promotora se encuentra en el apéndice de esta memoria y se depositó en la base de datos de secuencias *GenBank* con el número de acceso AM489729. Al analizar *in silico* dicha secuencia, en primer lugar se buscaron los elementos fundamentales de una región reguladora de este tipo. En las posiciones -92 y -453 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'. También se encontró en las posiciones -74 y -254 (en la cadena codificante), y -355, -506 y -601 (en la cadena complementaria) respecto al condón de inicio, una caja CCAAT que se ajustó 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).

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, restringida a hongos.

Se localizaron tres secuencias 5'-SYGGRG-3', todas ellas en la cadena codificante (en las posiciones -105, -373 y -439). En 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. Reprime un gran número de genes en presencia de glucosa (Kulmburg y col., 1993; Ilmen y col., 1996).

También aparecieron tres secuencias 5' HGATAR 3', dos de ellas en la cadena codificante (-26 y -565) y otra en la cadena complementaria (-303). Esta secuencia está implicada en la unión de factores de transcripción (AreA o Nit2) relacionados con el metabolismo del nitrógeno. En *A. nidulans*, AreA regula el metabolismo del nitrógeno en respuesta a los niveles extracelulares de glutamina (Ravagnani y col., 1997). Su homólogo en *N. crassa* es Nit2 (Scazzocchio y col., 2000).

Además se encontraron, entre otros, posibles sitios de unión para los siguientes factores de transcripción:

- AbaA: regulador que interviene en la diferenciación de los conidios y, por tanto, en la activación de genes implicados en el desarrollo (Adrianopoulos y Timberlake, 1994).
- MCM1: regulador de genes implicados en el control del ciclo celular, en la síntesis de pared celular, en el metabolismo celular, en la activación de glucoproteínas secretadas en condiciones de choque térmico y en el metabolismo de la arginina (Kuo y col., 1994). Miembro de la familia MADS de factores trans, regulan los genes por interacción con distintos cofactores como alpha1, Ste12 y alpha2 (Mead y col., 2002; Abraham y col., 2005).
- GCR1: regulador de genes glucolíticos (Uemura y col., 1997).
- GAL4 y LAC9: activadores que median la respuesta a la presencia de galactosa (Bram y col., 1986; Wray y col., 1987).
- MAT1: regulador que interviene en la diferenciación sexual (Kjaerulff y col., 1997).
- XBP1 (*XhoI site-binding protein 1*): regulador negativo que actúa sobre la transcripción de genes específicos, pudiendo causar un retraso pasajero del ciclo celular bajo condiciones de estrés como choque térmico, alta osmolaridad, estrés oxidativo o déficit de glucosa (Mai y Breeden, 1997).
- HSF: responsable de la regulación de la expresión de las proteínas de choque térmico (Fernández y col., 1994).
- PHO4: en *S. cerevisiae* activa la expresión de una fosfatasa ácida (PHO5) en condiciones limitantes de fuente de fósforo (Ficher y Goding, 1992).

También se analizó el entorno del lugar de inicio de la traducción, que presenta una secuencia consenso característica (Goldman y col., 1998). Las coincidencias se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Región adyacente al codón de iniciación de la traducción que aparece más frecuentemente en *Trichoderma* y la que presenta el gen *Thpg1* (Goldman y col., 1998). En negrita 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>Thpg1</i>	A	C	A	A	C	A	U	G	A	C	C

3.3. Análisis de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína ThPG1

La secuencia del gen *Thpg1* tenía 1387 pb y al traducirla, teniendo en cuenta ya la presencia de los intrones, se obtuvo una secuencia de 380 aminoácidos. La secuencia completa de la región génica clonada se encuentra en el apéndice de esta memoria y se depositó en la base de datos de secuencias *GenBank* con el número de acceso AM421521. El peso molecular teórico de la proteína es de 38,29 kDa y su punto isoeléctrico teórico, 5,02. La estructura primaria de la proteína deducida consta de 18 aminoácidos básicos (K, R) (5,9%), 25 ácidos (D, E) (8,2%), 144 polares (N, C, Q, S, T, Y) (47,2%) y 118 hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V) (38,7%). En la composición de aminoácidos, el que se encuentra en mayor proporción es la alanina (11,3%), seguido de la valina (10,4%) y la leucina (9,2%).

Al analizar *in silico* la secuencia de aminoácidos a través del programa *SignalP* v2.0, se detectó la presencia de un péptido señal (posible punto de ruptura entre los aminoácidos Ala²¹-Leu²²). Esto se explica si observamos el perfil hidropático de ThPG1 (Figura 18), calculado según el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982). La presencia de péptidos señal se relaciona con un alto grado de hidrofobicidad en esa región y vemos que en esta proteína hay un marcado carácter hidrofóbico al principio de la secuencia. El análisis realizado con el programa *ProP* v.1.0 para determinar prepro-péptidos dentro de la secuencia, no reveló ningún sitio de corte en residuos de arginina o lisina

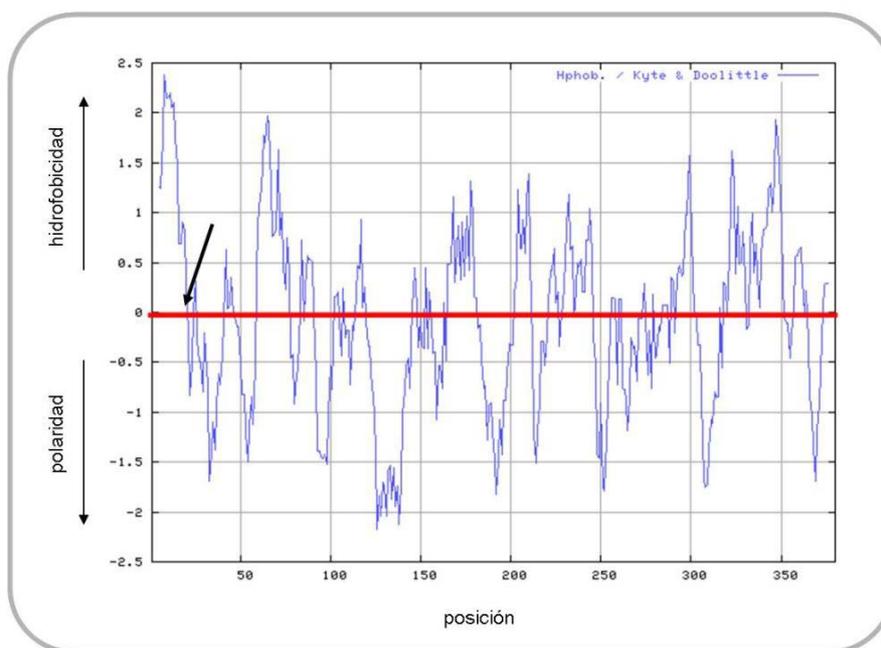


Figura 18. Representación gráfica del perfil hidropático de ThPG1 calculado mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982). Se indica con una flecha la zona de ruptura del péptido señal.

Se realizó una predicción *in silico* de la estructura secundaria de la proteína mediante el programa *PSIPRED* (Figura 19). Se observó que en la estructura secundaria de ThPG1 predominaban las regiones de hojas β . Además, el análisis de la secuencia de la proteína mediante la aplicación *Scan Prosite* reveló la presencia de posibles sitios de fosforilación, miristilación, sulfatación y amidación en los siguientes residuos (Figura 19):

- fosforilación por proteín kinasa C: serina 55 y treonina 282.
- fosforilación por proteín kinasa II: serinas 119, 185 y 276.
- miristilación: glicinas 9, 45, 108, 115, 133, 174, 190, 201, 225, 232, 240, 281, 290, 314, 334, 348 y 369.
- glucosilación: asparaginas 227 y 329.
- amidación: glicina 365.

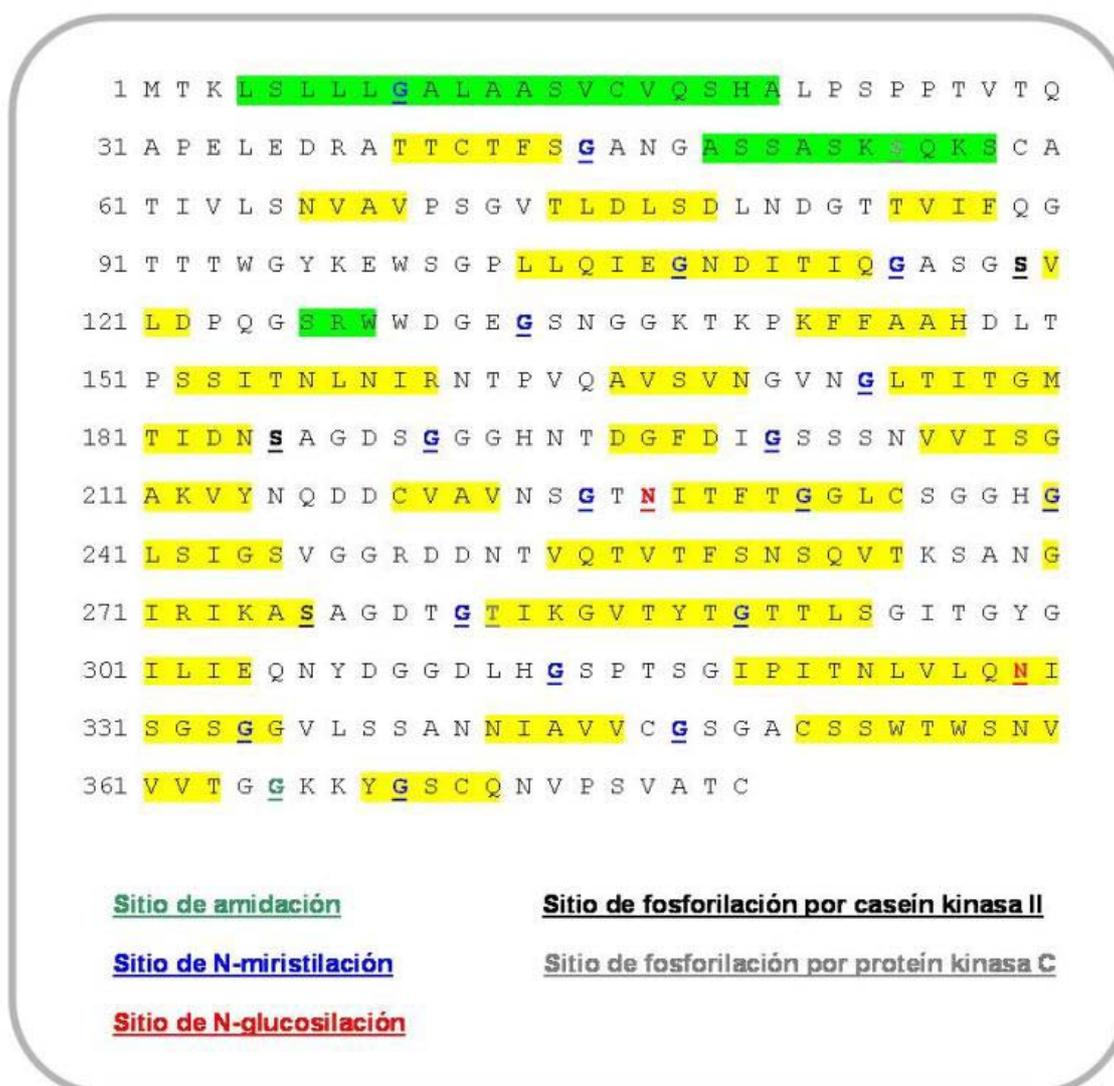


Figura 19. Secuencia de la proteína ThPG1 incluyendo la predicción de su estructura secundaria llevada a cabo con el programa *PSIPRED* (Jones, 1999). Se han marcado con fondo verde las conformaciones en hélice α y con fondo amarillo las conformaciones en hoja plegada β . También se incluyen los posibles sitios de fosforilación (en color gris y negro), miristilación (en color azul), glucosilación (en color rojo) y amidación (en color verde) según el programa *Scan Prosite* (www.expasy.org/tools/scanprosite).

La secuencia total de la proteína ThPG1 se comparó mediante el algoritmo FASTA con las secuencias presentes en la base de datos UNIPROT. Las proteínas que presentaron un mayor nivel de similitud con ThPG1 se recogen en la Tabla 7. La mayor parte de estas proteínas correspondían a endoPGs descritas en diversos hongos, aunque la función de algunas de ellas era desconocida debido a que sus secuencias procedían de proyectos de secuenciación.

Tabla 7. Proteínas con mayor similitud de secuencia con ThPG1. El análisis se llevó a cabo empleando el algoritmo FASTA sobre la base de datos UNIPROT. Las proteínas están ordenadas en función de su valor E. Id: identidad

Proteína	Organismo	Nº aa	E	% Id	Nº Acceso	Referencia
poligalacturonasa hipotética	<i>Neosartorya fischeri</i>	378	3,E-100	73,6	A1D145_NEOFI	
poligalacturonasa hipotética	<i>Aspergillus fumigatus</i>	378	1,E-99	73,4	BOXPA1_ASPFU	
poligalacturonasa	<i>Penicillium occitanis</i>	384	2,E-98	72,1	A7LH56_9EURO	(Trigui-Lahiani y Gargouri, 2007)
endopoligalacturonasa hipotética	<i>Emericella nidulans</i>	380	1,E-95	70,9	Q5ATQ3_EMENI	
poligalacturonasa	<i>Ophiostoma ulmi</i>	379	1,E-94	68,2	Q4PJU8_OPHUL	
poligalacturonasa	<i>O. novo-ulmi</i>	379	1,E-94	67,9	O59934_OPHNO	
endopoligalacturonasa PG1	<i>Leptosphaeria maculans</i>	384	8,E-91	65,4	Q9P8MO_LEPMC	
endopoligalacturonasa	<i>Alternaria alternata</i>	379	1,E-90	66,5	Q9C4AO_ALTAL	(Isshiki y col, 1997)
endopoligalacturonasa	<i>A. citri</i>	379	2,E-90	66,2	Q9C4A1_9PLEO	

En la Figura 20 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de ThPG1 y algunas de las proteínas que aparecen recogidas en la Tabla 7, realizado con el programa *ClustalX*. En dicho alineamiento se observan las 4 regiones conservadas de estas proteínas que han sido descritas en bibliografía: Asn¹⁹⁴-Thr¹⁹⁵-Asp¹⁹⁶, Asp²¹⁷-Asp²¹⁸, Gly²³⁸-His²³⁹-Gly²⁴⁰ y Arg²⁷²-X-Lys²⁷⁴ (resaltados con un recuadro rojo y según la numeración correspondiente a la secuencia de la proteína ThPG1). Dentro de estas regiones se localizan los residuos conservados en todas las endoPGs y que forman parte del centro catalítico; los residuos Asn¹⁹⁴, Asp¹⁹⁶, Asp²¹⁷, Asp²¹⁸, His²³⁹ y Gly²⁴⁰ estarían

implicados en la hidrólisis del sustrato; los residuos Arg²⁷² y Lys²⁷⁴ estarían implicados en la unión al sustrato (van Santen y col., 1999).

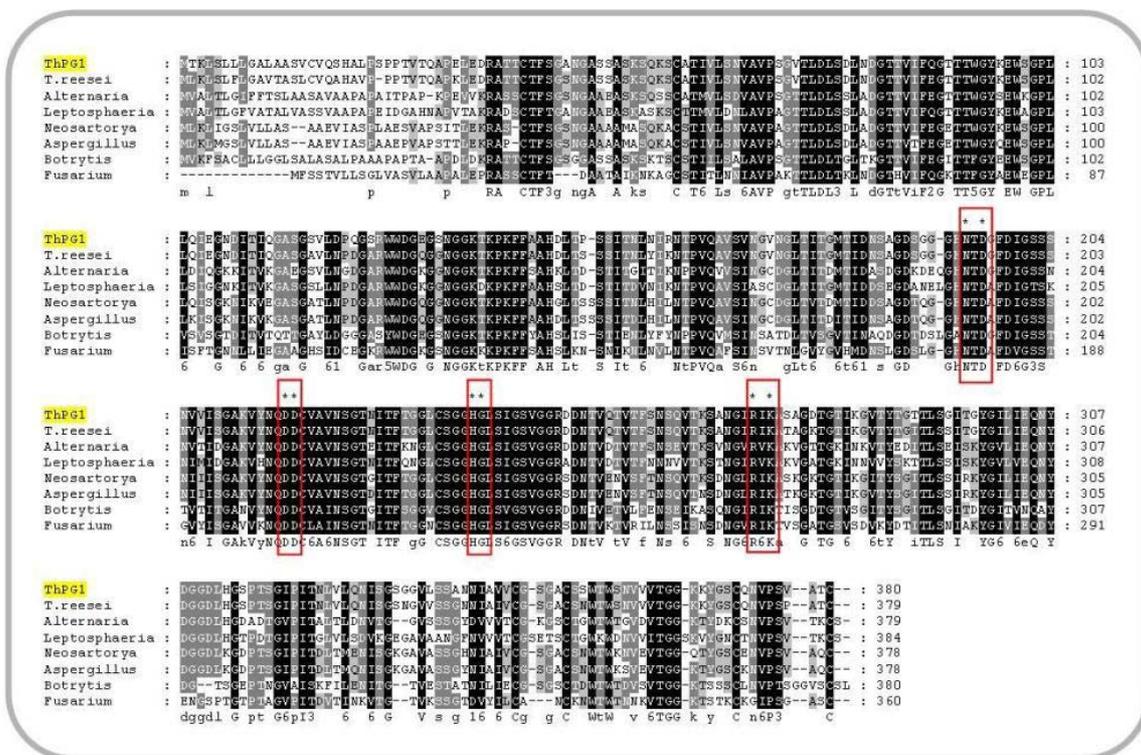


Figura 20. Alineamiento y comparación de la secuencia de aminoácidos de ThPG1 con otras endopoligalacturonas descritas en diversos hongos: *T. reesei* (contig C_1000682; <http://genome.jgi-psf.org>), *A. alternata* (número de acceso GenBank: BAB32924), *L. maculans* (AAF70169), *N. fischeri* (XP_001264035), *A. fumigatus* (XP_753090), *B. cinerea* (AAC24955) y *F. oxysporum* (BAE97103). Las 4 regiones conservadas descritas en bibliografía aparecen marcadas en recuadros rojos. Los aminoácidos conservados en todas las endopoligalacturonas que forman parte del centro activo de la proteína aparecen marcados con un asterisco (*). El alineamiento se llevó a cabo con el programa *ClustalX* (Thompson y col., 1994).

Se estudió la estructura de dominios de ThPG1 en la base de datos SMART (<http://smart.embl.de>) y se encontró un dominio glicosílico (*Glyco_Hydro_28*, glucosil hidrolasas familia 28, pfam 00295) que se extendía desde el aminoácido 59 hasta el final de la proteína. Este dominio glicosílico engloba un amplio rango de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular de las plantas. La predicción de la estructura terciaria para la proteína ThPG1 se realizó con el programa *ESyPred3D* v1.0 por comparación con la cadena 'A' de la endopoligalacturonasa cristalizada de *Colletotrichum lupini* (2IQ7_A), con un índice de similitud del 54,4% (Figura 21). Se utilizó la secuencia de aminoácidos de la región comprendida entre los aminoácidos

Ala³⁸ y Cys³⁸⁰. El modelo obtenido para ThPG1 muestra la disposición típica en hélice β paralela dextrógira, típica de las enzimas que degradan la pectina (Herron y col., 2000). Este tipo de dominio está constituido por repeticiones de giros formados por hélices β , que a su vez están compuestas por varias láminas beta unidas (en amarillo en la figura). El sitio de unión al sustrato se localiza en la hendidura que se forma en la parte exterior de la hélice β (línea roja en la figura) y donde se localizan los residuos que componen el centro catalítico de la proteína (señalados en la figura).

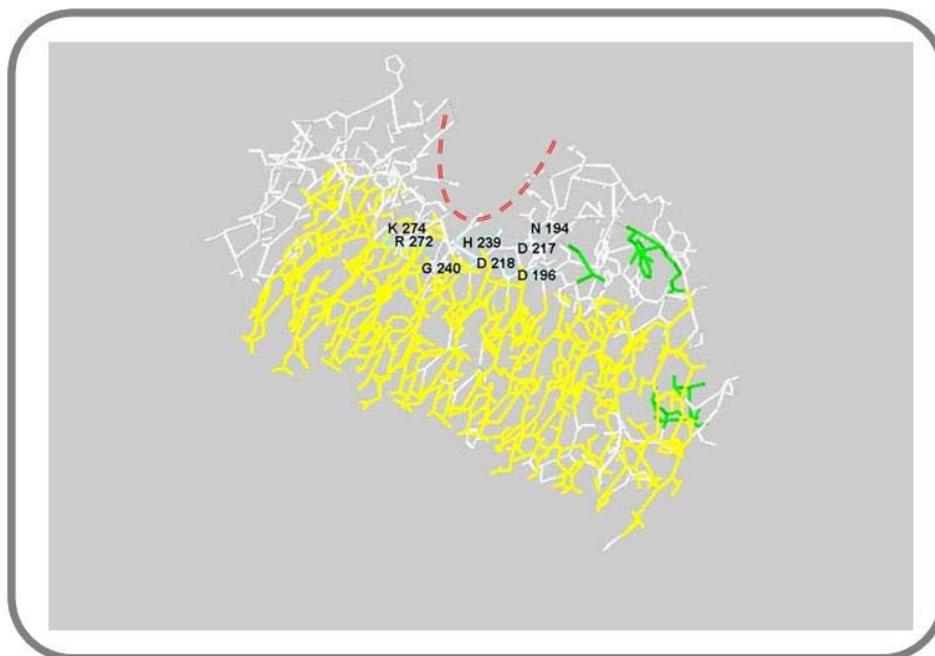


Figura 21. Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína ThPG1 utilizando el programa *DeepView-Swiss-PdbViewer*. En amarillo se representa las hélices β y en verde las hélices α . La hendidura que forma el sitio catalítico de la enzima está representada con una línea roja discontinua junto a los aminoácidos que constituyen el centro activo.

El destino celular más probable de ThPG1 se simuló mediante el uso del programa *PSORT II* (Nakai y Horton, 1999) que le asignó, con una probabilidad del 56%, una ubicación extracelular.

4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se llevó a cabo un análisis filogenético tras un alineamiento de *Thpg1* con otras 15 secuencias de genes que codifican endoPGs y endoPGs hipotéticas depositadas en la base de datos *GenBank*. Se incluyeron genes de 8 ascomicetos, 1 basidiomiceto, 1 oomiceto y 4 plantas. Además se incluyó un gen que codifica una exoPG hipotética de *T. reesei*. En la Figura 22 se muestra el árbol filogenético *neighbour-joining* (NJ), basado en distancias, y valores de un análisis *bootstrap* procedentes de 1000 repeticiones. Se pueden observar dos cuerpos principales, uno donde se sitúan las secuencias de hongos y del oomiceto, y otro donde se sitúan las secuencias de plantas. Además, la secuencia del oomiceto queda separada de las de hongos por un valor *bootstrap* del 59%. La secuencia *Thpg1* de *T. harzianum* T34 se agrupó con la endoPG hipotética de *T. virens* formando un subgrupo soportado por un valor *bootstrap* del 100%.

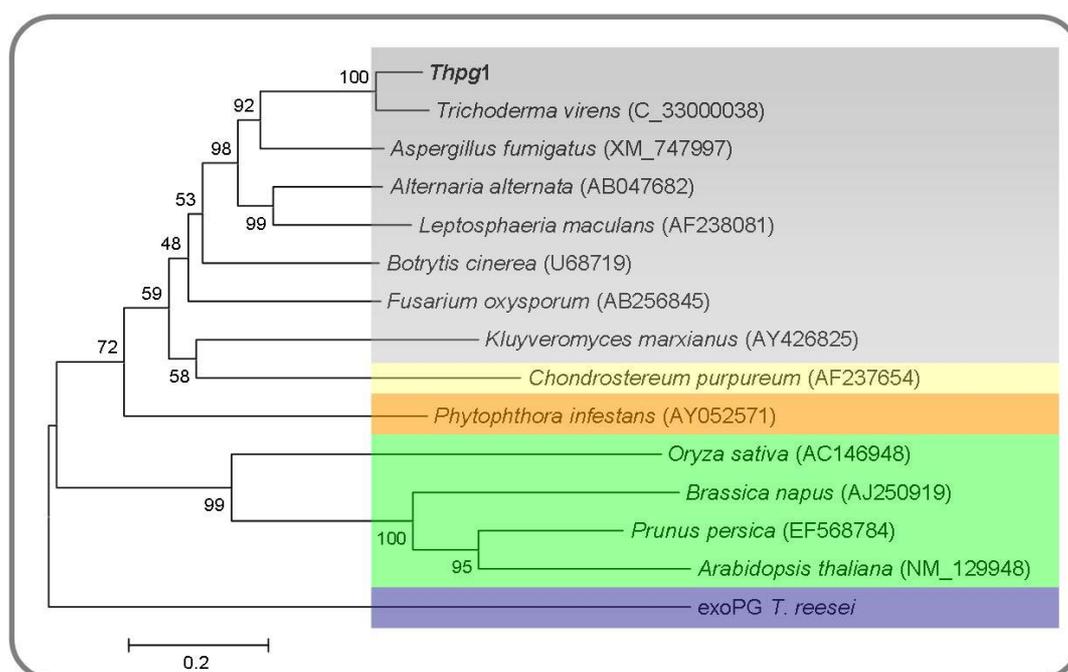


Figura 22. Árbol filogenético de *Thpg1* de *T. harzianum* T34 con otras 13 secuencias de endoPGs y una exoPG hipotética de *T. reesei* (en color azul) (C_33000038, <http://genome.jgi-psf.org/>). En color gris se presentan los ascomicetos, en color amarillo el basidiomiceto, en naranja el oomiceto y en verde las secuencias de plantas. El alineamiento se llevó a cabo con el programa *ClustalX* (Thompson y col., 1994) y el árbol *neighbour-joining* se obtuvo utilizando el programa *MEGA* v 2.1 (Kumar y col., 2001). Los números en las ramas indican los valores *bootstrap* procedentes de un análisis de 1.000 repeticiones. A la derecha de cada especie aparece su número de acceso en la base de datos *GenBank*. El acceso a la secuencia de *T. virens* se encuentra en la página web <http://genome.jgi-psf.org/> (e_gw1.27.146.1). La barra representa 20 sustituciones por cada 100 aminoácidos.

5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *Thpg1*

El patrón de expresión del gen *Thpg1* se analizó mediante hibridaciones tipo *Northern*. Para ello, se utilizaron 15 µg de ARN total extraído a partir de micelio de *T. harzianum* T34 crecido en MM (Penttilä y col., 1987), sin glucosa, durante 4, 8 ó 24 horas, bajo distintas condiciones de cultivo, tal y como se describe en el apartado 4.1.4 de Materiales y Métodos. Se utilizaron condiciones de inducción que simulaban situaciones de estrés biótico como: presencia de pectina al 0,1 y 0,5%, presencia de PGA al 0,1 y 0,5%, plantas de tomate al 1% y paredes celulares de los hongos *B. cinerea* 26, *R. solani* 19 o *P. ultimum* 8 al 1%. También se cultivó *T. harzianum* T34 en condiciones de déficit de fuente de carbono, déficit de nitrógeno (sulfato amónico 50 mg/L) y una combinación de ambas situaciones. Todas estas condiciones se realizaron en ausencia de glucosa, excepto la condición con glucosa al 2%. Como sonda se utilizó la secuencia de la ORF del gen *Thpg1*. Esta sonda se obtuvo marcando radiactivamente el producto de PCR obtenido tras amplificar el ADN plasmídico clonado en el vector pGEM-T[®] Easy con los oligonucleótidos endop-1 y endop-2. Como control de carga se utilizó el ARNr 18S obtenido, mediante PCR, con ADN genómico de *T. harzianum* T34, usado como molde, y los oligonucleótidos 18S-u y 18S-r.

Se realizaron hibridaciones tipo *Northern* en dos membranas diferentes que fueron procesadas en condiciones idénticas y el tiempo de exposición fue el mismo para ambas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23.

El gen *Thpg1* se expresó a tiempos largos (24 horas), en aquellas condiciones que contenían plantas de planta o componentes de la pared celular de plantas, como la pectina o el ácido poligalacturónico. Los mayores niveles de transcrito se detectaron tras cultivar la cepa T34 en presencia de pectina al 0,5% durante 24 horas, y en menor medida, en presencia de PGA al 0,5% durante 24 horas. También se pudo observar una ligera expresión del gen tras cultivar el hongo en presencia de plantas de tomate al 1% durante 24 h, pectina al 0,1% durante 24 h y pectina al 0,5% durante 8 h. En el resto de condiciones analizadas no se observó ninguna señal de expresión.

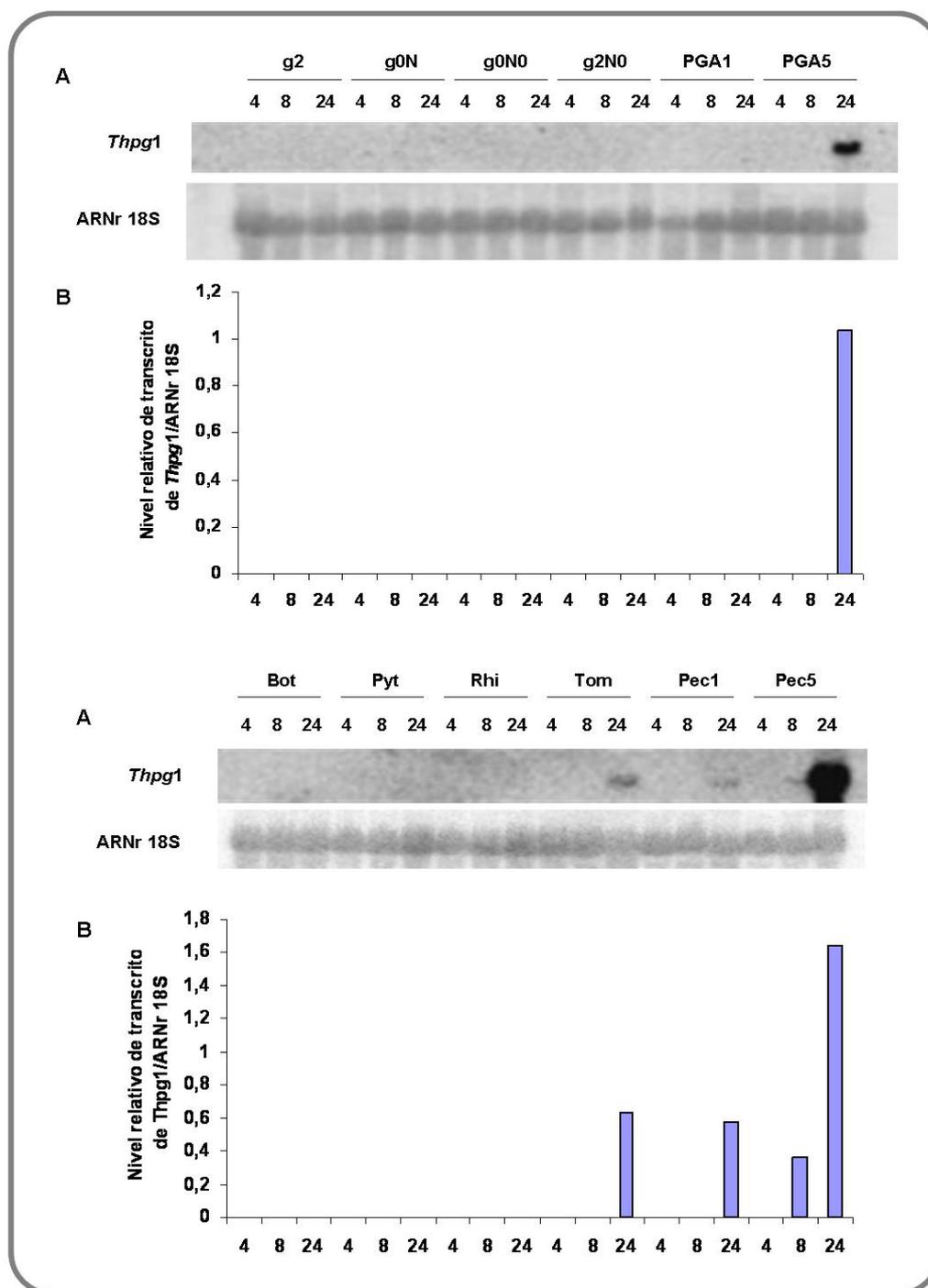


Figura 23. (A) Análisis tipo *Northern* de la expresión de *Thpg1* de *T. harzianum* T34. El experimento se realizó con 15 μ g de ARN total extraído de micelio de la cepa T34 crecido en MM (Penttilä y col., 1987) bajo las siguientes condiciones: glucosa al 2% (g2), ausencia de glucosa (g0N), glucosa al 2% y déficit de nitrógeno (sulfato amónico 50 mg/L) (g2N0), ácido poligalacturónico al 0,1 (PGA1) ó 0,5% (PGA5), paredes celulares de *B. cinerea* (Bot), *P. ultimum* (Pyt) o *R. solani* (Rhi) al 1%, plantas de tomate al 1% (Tom) y pectina al 0,1 (Pec1) ó 0,5% (Pec5). Los micelios se recogieron a las 4, 8 ó 24 horas de crecimiento de la cepa T34. Como control de carga se utilizó el ARNr 18S. **(B)** Niveles relativos de transcrito de *Thpg1* frente al ARNr 18S.

6. ANÁLISIS SOUTHERN DE *Thpg1*. PRESENCIA EN OTRAS CEPAS DE *Trichoderma*

Se realizó un experimento tipo *Southern* para determinar el número de copias del gen *Thpg1* en el genoma de *T. harzianum* T34, así como para analizar la presencia de un gen homólogo en otras especies del género *Trichoderma*. Para ello se empleó ADN genómico de las cepas *T. atroviride* T11, *T. harzianum* T22, *T. asperellum* T25, *T. harzianum* T34, *T. longibrachiatum* T52 y *T. virens* T59, digerido con las enzimas *Bam*HI o *Xho*I. El protocolo de extracción del ADN genómico se recoge en el apartado 9.1.4.2 de Materiales y Métodos. Como sonda se utilizó la secuencia completa del gen *Thpg1*, marcada con digoxigenina.

Tras hibridar y lavar la membrana, en condiciones restrictivas (65°C), se observó una única banda en el carril que contenía ADN genómico de *T. harzianum* T34 digerido con la enzima *Xho*I, sin dianas nucleotídicas dentro de la sonda utilizada. Por otro lado, se observaron dos bandas en el carril que contenía ADN genómico de *T. harzianum* T34 digerido con la enzima *Bam*HI, con una diana nucleotídica dentro de la sonda utilizada. El patrón de bandas de hibridación indica que *Thpg1* se encuentra en una única copia en el genoma de *T. harzianum* T34 (Figura 24).

Por otro lado, se detectó una y dos bandas de hibridación en los carriles que contenían el ADN obtenido de las cepas *T. atroviride* T11 digerido con *Bam*HI o *Xho*I, respectivamente. Se detectó también una única banda en los carriles correspondientes al ADN de las cepas *T. harzianum* T22, *T. atroviride* T25 y *T. virens* T59 digerido con *Bam*HI o *Xho*I. Sin embargo, no se observaron bandas de hibridación en el carril que contenían el ADN de *T. longibrachiatum* T52 digerido con *Bam*HI, aunque si aparece una banda débil al digerir con *Xho*I. Este resultado sugiere la presencia de un gen homólogo a *Thpg1* en todas las cepas analizadas.

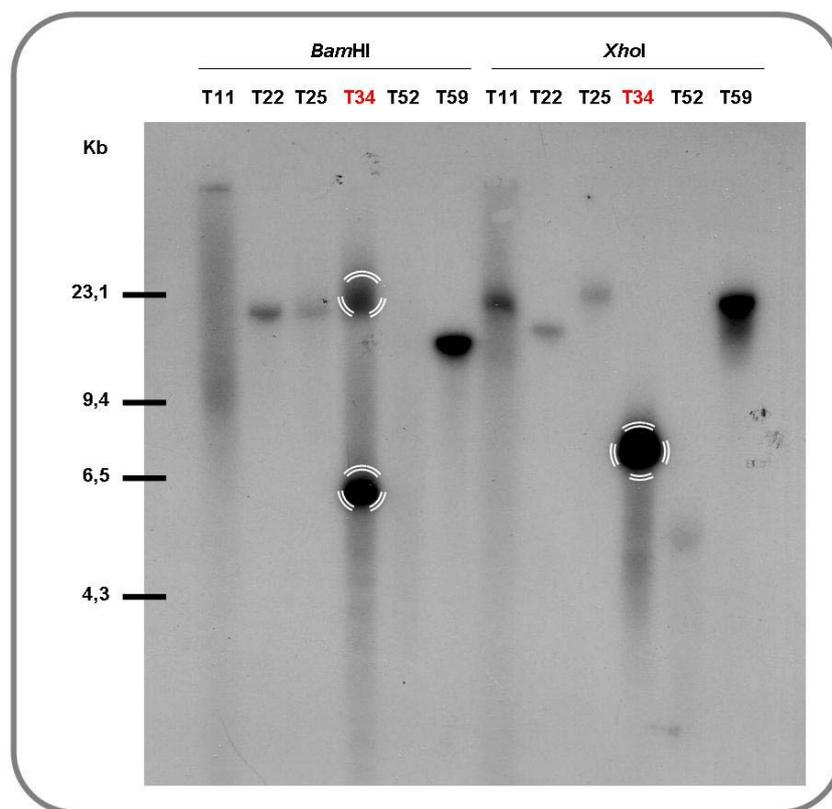


Figura 24. Análisis tipo *Southern* del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34, en distintas especies de *Trichoderma*: *T. atroviride* T11, *T. harzianum* T22, *T. asperellum* T25, *T. harzianum* T34, *T. longibrachiatum* T52 y *T. virens* T59. El ADN se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI o *Xho*I, y la hibridación se realizó en condiciones restrictivas usando el gen *Thpg1* como sonda. A la izquierda se representa el marcador de tamaños moleculares de ADN λ /*Hind*III (Roche).

7. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENDOPOLIGALACTURONASA EN LOS CULTIVOS DE *T. harzianum* T34.

La caracterización de la actividad endopoligalacturonasa de *T. harzianum* T34 se efectuó partiendo de algunas de las condiciones nutricionales donde se detectó expresión del gen *Thpg1*. Los sobrenadantes se recogieron y dializaron, en la forma que se describe en los apartados 4.1.4 y 12.3.2 de Materiales y Métodos.

7.1. Ensayo en placa

Una primera aproximación al estudio de la actividad de la proteína ThPG1, se realizó mediante un ensayo en medio sólido llevado a cabo como se describe en el apartado 12.5.1 de Materiales y Métodos. Se utilizó el sobrenadante recogido tras crecer la cepa T34 en un MM (Penttilä y col., 1987) suplementado con pectina al 0,5% durante 24 h, por ser ésta la condición que presentó los mayores niveles de expresión del gen *Thpg1*. Una vez incubada la placa, el revelado mostró un halo de lisis de 2,3 cm de diámetro en la condición analizada, utilizando como control una solución de medio mínimo (Figura 25).



Figura 25. Imagen del resultado de un ensayo de actividad poligalacturonasa en placa. El halo de lisis que se observa tras aplicar un extracto proteico concentrado de la cepa T34 corresponde a dicha actividad. Se usó como control una solución de medio mínimo.

7.2. Determinación de azúcares reductores (Somogyi-Nelson)

Otra vía para determinar la presencia de actividad endopoligalacturonasa en diferentes condiciones de cultivo del hongo, fue la determinación de azúcares reductores según el método de Somogyi, tal y como se describe en el apartado 12.5.2 de Materiales y Métodos. Este método está basado en la oxidación de azúcares y sustancias reductoras por compuestos orgánicos cúpricos en una solución alcalina.

Para este ensayo, se utilizaron los sobrenadantes de las condiciones en las que se detectó expresión del gen *Thpg1*. Además, se incluyó una nueva condición en la que se creció la cepa T34 en MM suplementado con pectina al 0,5% durante 36 horas.

Como se muestra en la Tabla 8, se detectó actividad solamente cuando en el medio de crecimiento se incluyó pectina al 0,5% durante 24 ó 36 horas. En el resto de condiciones de crecimiento (pectina al 0,1%, PGA al 0,1% y 0,5% o tomate al 1%) no se detectó actividad endopoligalacturonasa en las condiciones en las que se realizó el ensayo.

Tabla 8. Actividad endopoligalacturonasa, medida como unidades de azúcares reductores por mg de proteína total, utilizando como sustrato PGA.

Condición	U	mg proteína total	Actividad específica (U/mg)
planta de tomate 1% 4 horas	0	0,0815	0
planta de tomate 1% 8 horas	0	0,0865	0
planta de tomate 1% 24 horas	0	0,1302	0
PGA 0,1% 4 horas	0	0,0782	0
PGA 0,1% 8 horas	0	0,0769	0
PGA 0,1% 24 horas	0	0,1777	0
PGA 0,5% 4 horas	0	0,1244	0
PGA 0,5% 8 horas	0	0,1272	0
PGA 0,5% 24 horas	0	0,1425	0
pectina 0,1% 4 horas	0	0,0845	0
pectina 0,1% 8 horas	0	0,0869	0
pectina 0,1% 24 horas	0	0,1645	0
pectina 0,5% 4 horas	0	0,1505	0
pectina 0,5% 8 horas	0	0,1533	0
pectina 0,5% 24 horas	0,491	0,0966	5,08
pectina 0,5% 36 horas	0,504	0,1487	3,38

U, actividad total
Cada valor es media de tres repeticiones \pm la desviación estándar

7.3. Determinación de la actividad endopoligalacturonasa en geles de acrilamida

Puesto que no disponíamos de la proteína ThPG1 purificada, decidimos abordar la determinación del peso molecular mediante una electroforesis unidimensional en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), utilizando como patrón un marcador de pesos moleculares conocidos (BioRad), como se describe en el apartado 12.6 de Materiales y Métodos.

Se utilizó el sobrenadante de la condición en la que se detectaron los mayores niveles de expresión del gen *Thpg1*, en un MM suplementado con pectina al 0,5% durante 24 horas de crecimiento. Se trabajó a partir de una muestra concentrada 100 veces. El gel con el marcador se tiñó con azul de Coomassie mientras que para el gel con el extracto proteico se realizó una detección de la actividad endopoligalacturonasa.

En la Figura 26.A se puede observar un halo de lisis en el gel de acrilamida formado por una actividad endopoligalacturonasa, cuyo peso molecular aproximado se calculó después de extrapolar el valor de su distancia de migración (tomando como

punto el centro del halo), a la regresión lineal de los valores presentados por los patrones de peso molecular.

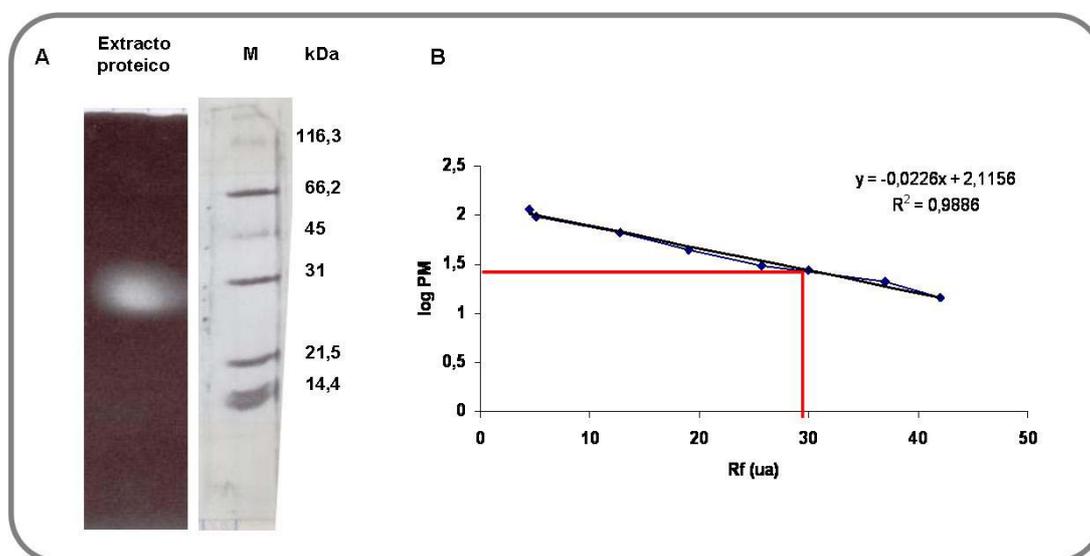


Figura 26. (A) Resultado de la separación electroforética unidimensional, realizada en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), de un extracto proteico obtenido tras crecer durante 24 h la cepa T34 en un MM suplementado con pectina al 0,5%. Posteriormente, se determinó la actividad endopoligalacturonasa en un gel de ácido poligalacturónico (para más detalles consultar el texto). (B) Se representan los logaritmos de los pesos moleculares del marcador (M) frente a la distancia de migración (Rf) medida en unidades arbitrarias.

Así, de acuerdo a la SDS-PAGE se obtuvo un valor aproximado del peso molecular de 28,8 kDa (Fig. 26.B).

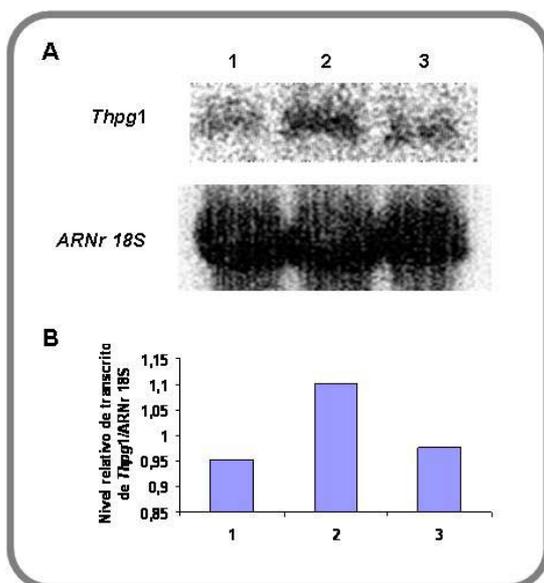
8. SISTEMAS DE INTERACCIÓN *T. harzianum*-PLANTA-PATÓGENO

8.1. Análisis de la expresión de *Thpg1*

Con objeto de determinar la función que pudiera desempeñar una endopoligalacturonasa de *T. harzianum* T34 en su relación con la planta, se decidió abordar el estudio de la expresión del gen *Thpg1* mediante *Northern*, en un sistema que simulara unas condiciones *in vivo*, lo más reales posibles, de interacción planta-patógeno-*Trichoderma*.

El ensayo se realizó según las condiciones descritas en el apartado 4.1.5 de Materiales y Métodos. Se realizó una extracción de ARN total a partir de los micelios liofilizados obtenidos en las distintas condiciones ensayadas. El estudio tipo *Northern* reveló expresión en las tres condiciones analizadas: (i) T34 vs tomate; (ii) T34 vs tomate y *P. ultimum*; (iii) T34 vs tomate y *R. solani*.

La expresión fue muy baja en todos los casos, ya que el patrón de expresión se obtuvo después de 72 horas de exposición. Además, la expresión fue ligeramente superior (1,2 veces mayor) en el caso de T34 vs tomate y *P.ultimum* (Figura 27).



8.2. Análisis proteómico: ThPG1

Para determinar el patrón de la proteína ThPG1 en un sistema *in vivo* de tres componentes, *Trichoderma*-planta-patógeno, se analizó el proteoma de la cepa silvestre T34 en las siguientes condiciones: (i) T34-tomate (control), (ii) T34-tomate-*B. cinerea*, (iii) T34-tomate-*P. ultimum* y (iv) T34-tomate-*R. solani* (Figura 28).

Las condiciones utilizadas en el 2D SDS-PAGE fueron pH3-10 para la primera dimensión (separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico) y 14-94 kDa que para la segunda dimensión (separación de las proteínas en función de su peso molecular). Se emplearon 400 μ g de proteínas totales, que se obtuvieron como se indica en el apartado 12.1 de Materiales y Métodos.

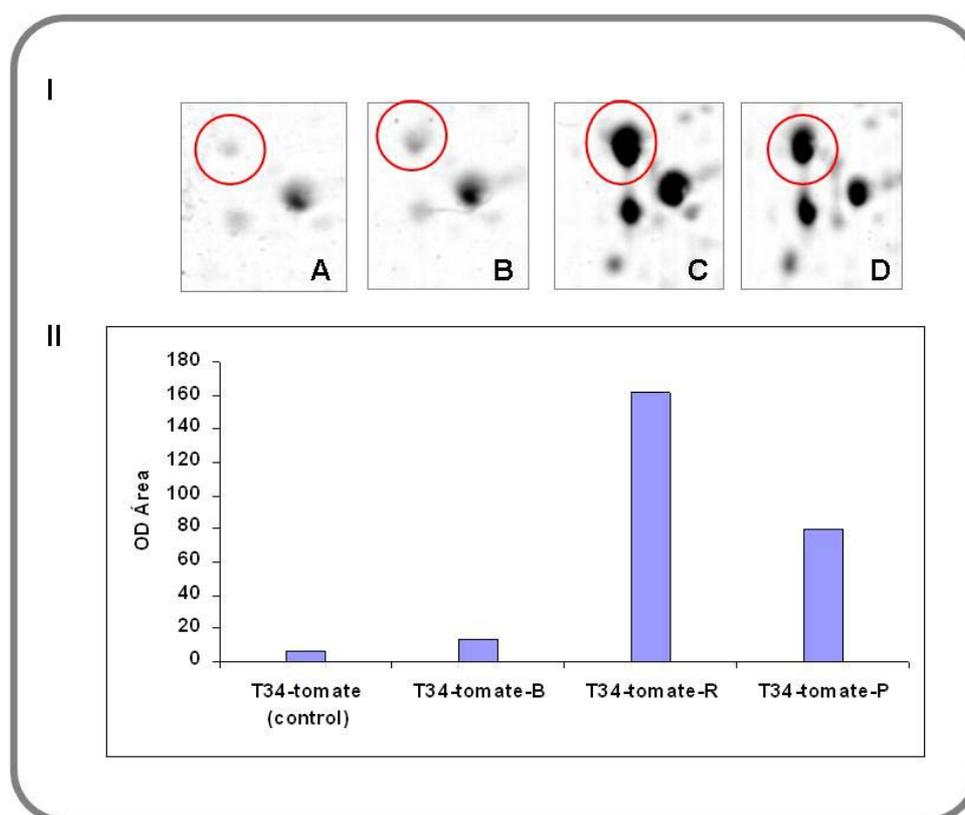


Figura 28. (I) Ampliación del 2D SDS-PAGE en la zona correspondiente al spot 0303 (señalado con un círculo rojo). El 2D SDS-PAGE se realizó con proteínas intracelulares obtenidas en las siguientes condiciones: **A**, T34-tomate (control); **B**, T34-tomate-*B. cinerea*; **C**, T34-tomate-*R. solani*; **D**, T34-tomate-*P. ultimum*. Para más detalles, consultar el texto. **(II)** Representación gráfica de los niveles de intensidad relativa del spot 0303.

El análisis comparativo de los cuatro proteomas, obtenidos como se detalla en el apartado 12.7 de Materiales y Métodos, mostró numerosos puntos diferenciales, que fueron seleccionados de acuerdo a su *PD-Quest*, para posteriormente ser sometidos a una espectrometría de masas y un posterior análisis *in silico* con objeto de buscar homologías con proteínas conocidas. Uno de los *spots* expresados diferencialmente en las distintas situaciones analizadas, mostró un alto grado de homología con endoPGs depositadas en bases de datos, concretamente con una endoPG de *A. niger* (CAB72126). Este resultado se confirmó con nuestra base de datos de ESTs de *Trichoderma*, al comprobar que el *spot* 0303 guardaba relación con la EST 10663. En la Figura 28.I se muestra ampliada, la zona correspondiente al *spot* 0303 del 2D SDS-PAGE realizado con las proteínas intracelulares de la cepa T34 en las condiciones arriba descritas.

Un análisis de la intensidad relativa del *spot* 0303 en las cuatro situaciones analizadas, mostró la señal más alta con los patógenos de raíz, con valores de 13 y 27 veces más, para *P. ultimum* y *R. solani* respectivamente (Figura 28.II). En la Tabla 9 se detallan los valores de densidad óptica obtenidos en este ensayo.

Tabla 9. Niveles de expresión relativa del *spot* 0303 en un sistema *Trichoderma*-planta-patógeno *in vivo*.

Condición	D.O. Área
T34-tomate (control)	6
T34-tomate- <i>B. cinerea</i>	12,9
T34-tomate- <i>R. solani</i>	161,7
T34-tomate- <i>P. ultimum</i>	79,8

DISCUSIÓN

Desde hace varias décadas, las cepas del género *Trichoderma* se vienen utilizando con éxito en el control biológico de hongos fitopatógenos en ambiente natural (Monte, 2001). Son numerosos los trabajos que recogen la habilidad de estas cepas para degradar biopolímeros de la pared celular de hongos patógenos que, por otro lado, no están presentes en los tejidos de las plantas. Así, muchos genes que codifican una gran variedad de enzimas líticas (quitinasas, glucanasas, proteasas, etc.) se han relacionado con las propiedades antifúngicas de distintas especies de *Trichoderma* (Lorito y col., 1998; Sanz y col., 2004).

En el año 2001, se inició el proyecto *TrichoEST*, sobre genómica funcional de *Trichoderma* spp., con el objetivo de identificar genes y productos génicos con valor biotecnológico en este hongo (Rey y col., 2004). En el estudio se incluyeron varias cepas pertenecientes a diferentes especies de *Trichoderma*, representantes de la diversidad genética existente en este género (Hermosa y col., 2004). Como resultado del proyecto se generó una colección de ESTs producidas en condiciones que simulaban procesos de biocontrol como micoparasitismo, interacción con la planta o distintos estreses nutritivos (Vizcaíno y col., 2006b).

De las más de 20.000 ESTs obtenidas en el proyecto, 8.710 procedían de genotecas de la cepa *T. harzianum* T34 que una vez analizadas permitió disponer de 3.478 transcritos únicos. Entre ellas, como cabía esperar dadas las condiciones en las que se prepararon las genotecas, había un gran número relacionadas con actividades hidrolíticas frente a polímeros de paredes fúngicas y vegetales. Una de estas ESTs, la 10663 procedente de la genoteca L15, presentó una alta similitud con genes relacionados con endoPGs depositados en bases de datos.

No debemos olvidar que la pectina es uno de los principales constituyentes de la pared celular primaria de las plantas que, de manera general, actúa como barrera física frente al ataque de patógenos y que éstos últimos poseen una batería enzimática capaz de degradarla, pudiendo actuar como factores de virulencia en la planta (Lang y Dörnenburg, 2000). En este sentido, los trabajos encaminados a desvelar el papel que tienen las endoPGs fúngicas en la patogénesis, no permiten asegurar, en todos los casos, que estas enzimas constituyan un factor de virulencia. Mientras que la disrupción de genes que codifican endoPGs demostró, en *C. purpurea*, una implicación de éstas en procesos patogénicos (Oeser y col., 2002), los trabajos en *C. parasitica* (Gao y col., 1996) y *F. oxysporum* (García-Maceira y col., 2001) sugerían que estas enzimas no eran esenciales en esos procesos. Por otro parte, la actividad enzimática de estas proteínas

provoca la liberación de moléculas que actúan como elicitores de las respuestas de defensa en planta (D'Ovidio y col., 2004a).

La gran diversidad de organismos (animales, plantas y microorganismos) que se encuentran en el suelo, implica una gran variedad de interacciones biológicas entre ellos. En este sentido, *Trichoderma* es un hongo ubicuo, capaz de crecer en sustratos muy diversos, con una destacada habilidad para competir por el alimento y por el espacio, características que lo convierten en un excelente colonizador y descomponedor de materia orgánica vegetal. Por otro lado, se sabe que *Trichoderma*, al menos frente a los hongos fitopatógenos, produce de forma secuencial una batería de CWDEs. También se sabe, que las endoPGs son las primeras pectinasas que actúan durante la hidrólisis de la pectina (Annis y Goodwin, 1997). Estos hechos nos permitirían suponer que la producción de las enzimas de *Trichoderma*, capaces de degradar material vegetal, se producirían de manera similar a las inducidas por las paredes celulares de hongos fitopatógenos. Así, las endoPGs permitirían al resto de enzimas secretadas por *Trichoderma* el acceso a la hemicelulosa y la celulosa

Aún no está claro cuál es el mecanismo por el que *Trichoderma* spp. coloniza el sistema radical de la planta, estableciendo una simbiosis avirulenta y desencadenando una respuesta defensiva en la misma (Harman y col., 2004). Son pocos los estudios que reflejan los beneficios que ocasiona *Trichoderma* spp. en la planta (Yedidia y col., 1999; Harman y col., 2004; Vinale y col., 2008) pero son más escasos los trabajos en los que la interacción *Trichoderma*-planta-patógeno se estudia desde un punto de vista molecular (Marra y col., 2006; Woo et al., 2006; Alfano y col., 2007; Shorest y Harman, 2008). Teniendo en cuenta las características que presentan las endoPGs y el hongo *Trichoderma*, el estudio de la endoPG aislada en este trabajo se orientó hacia su posible papel elicitor, ya que anteriormente se habían identificado en *Trichoderma* otras moléculas que actúan como inductoras de las respuestas de defensa de las plantas (Woo y col., 2006).

Se identificó la EST 10663, procedente de una genoteca de ADNc de *T. harzianum* T34 (L15), por su alto grado de similitud con secuencias, presentes en bases de datos, que codifican genes relacionados con endoPGs. Esta EST se utilizó como punto de partida para estudiar el sistema pectinolítico en *T. harzianum*, una de las especies más utilizadas en el control biológico de hongos fitopatógenos.

Para el aislamiento del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34, a partir de la EST 10663, se utilizó una genoteca de ADN genómico de *T. harzianum* T34 (L01) y la genoteca L15 de *T. harzianum* T34, de la que procedía la EST. Se secuenciaron 2199 pb de la región génica de *Thpg1*, de los cuales 812 pb correspondieron a la región promotora y 1387 pb al resto del gen *Thpg1*. El ADNc que se amplificó a partir de la genoteca L15 mostró un tamaño de 1143 pb. La diferencia de tamaño entre ADN genómico (1387 pb) y ADNc (1143 pb), se debió a la presencia de cuatro intrones de

74, 60, 55 y 55 pb, en los que se localizaron, como se muestra en la Tabla 5, las secuencias consenso típicas de los extremos 5' y 3', y del "lazo", excepto en el intrón 1. En este último, la secuencia de inicio no mostraba tanta similitud con la secuencia consenso. En general, los genes que codifican endoPGs fúngicas presentan de uno a cuatro intrones, aunque también hay casos de endoPGs que carecen de ellos. La familia de endoPGs de *B. cinerea* refleja esta variedad en el número de intrones (Wubben y col., 1999). Además el tamaño de los intrones del gen *Thpg1* encaja en el rango de tamaños, 50 a 81 pb, observado para intrones de genes que codifican otras endoPGs fúngicas.

En cuanto al estudio de la expresión del gen *Thpg1* *in vitro*, los resultados obtenidos en el análisis tipo *Northern* y el análisis *in silico* de los 812 pb de la región promotora, permiten concluir que la expresión de este gen está regulada a nivel transcripcional (Lang y Dörnenburg, 2000).

Considerando los motivos teóricos localizados en la región promotora de *Thpg1* y que la EST 10663 procedía de la genoteca de ADNc L15, preparada con una mezcla de PGA, CMC, pectinas, xilanos y hambre de glucosa, los estudios de la expresión de *Thpg1* se llevaron a cabo cultivando el hongo en condiciones relativas a estas situaciones. Del conjunto de condiciones ensayadas, se observó expresión de *Thpg1* únicamente tras cultivar el hongo en presencia de plantas de tomate al 1%, pectina al 0,1 ó 0,5%, o uno de sus derivados, PGA al 0,5%, como fuente de carbono. Por tanto, es evidente que existe una regulación de la expresión de *Thpg1* por sustrato y productos finales del metabolismo que están estructuralmente relacionados con el sustrato (D'Ovidio y col. 2004a). Así, la regulación por sustrato se ha descrito en la mayoría de los genes que codifican endoPGs de hongos (Wubben y col., 2000; Cotton y col., 2003). Por ejemplo, se ha descrito en los genes *pgA* y *pgB*, de *A. niger*, que la utilización de diferentes fuentes de carbono como ácido galacturónico, ácido galacturónico en combinación con ramnosa o PGA, produce una expresión diferencial de los mismos (Parenicova y col., 2000). Por otra parte, la mayor expresión de *Thpg1* se detectó en presencia de pectina al 0,5%, siendo menor con PGA al 0,5%. También, se detectó mayor expresión de *Thpg1* en pectina al 0,5% que al 0,1%. Sin embargo, estudios realizados sobre la expresión del gen *pppg1* de *P. parasitica*, mostraron que ésta disminuía al aumentar la concentración de pectina en el medio (Yan y Liou, 2005).

Otro de los mecanismos de regulación de las endoPGs es la represión catabólica (D'Ovidio y col., 2004a). Se ha descrito que varios genes que codifican endoPGs son reprimidos por la presencia en el medio de catabolitos del carbono, tales como la glucosa (D'Ovidio y col., 2004a). Sin embargo, también se ha visto que este mecanismo de regulación no es característico de todos los genes que codifican endoPGs, sirviendo como ejemplo dos genes de *B. cinerea*, *Bcpg4* y *Bcpg1*, que se reprimen (*Bcpg4*) o no (*Bcpg1*) por glucosa (Wubben y col., 2000). En este sentido, no se observó expresión de *Thpg1* cuando se añadió glucosa al 2% al medio de cultivo. No obstante, tampoco se

detectó expresión del gen cuando el hongo se cultivó en un medio mínimo con ausencia de glucosa, por lo que no parece que la represión por glucosa sea un mecanismo de regulación de este gen a pesar de que en su promotor se detectaron tres motivos relacionados con la unión de proteínas implicadas en la represión catabólica (Cre1).

A pesar de que en la mayoría de los promotores de estos genes se localiza la secuencia consenso (5'-GCCARG-3') que es reconocida por el factor de transcripción *PacC*, implicado en la regulación de genes por pH (Tilburn y col., 1995), como ocurre en hongos como *Aspergillus* spp. (De Vries y Visser, 2001), *B. cinerea* (Wubben y col., 2000), *S. sclerotiorum* (Rollins y Dickman, 2001) o *F. oxysporum* (Caracuel y col., 2003), no se encontró ninguna secuencia similar en el promotor de *Thpg1*. En este estudio se analizó la expresión del gen *Thpg1* sólo a pH 5,5. Por tanto, no puede concluirse que no exista una regulación de este gen por pH únicamente por la ausencia de este motivo en el promotor.

Otra secuencia localizada en el promotor de *Thpg1*, que está presente en la mayoría de genes relativos a estas enzimas y, a su vez, en los genes que codifican CWDEs de *Trichoderma* spp., es la caja CCAAT a la que se une un complejo trimérico, Hap2/3/5 (Zeilinger y col., 2001). La función de este complejo se ha estudiado en la expresión de genes como la acetamidasa de *Aspergillus* spp. (De Vries y Visser, 2001) y también, en los promotores de otras CWDEs como xilanasas o celulasas de *Trichoderma* (Mach y Zeilinger, 2003). En este último se ha visto que el complejo trimérico estaría implicado en el aumento de la expresión de estos genes. Por ejemplo, se ha visto que una mutación en la secuencia CCAAT del gen que codifica la celobiohidrolasa II (*cbh2*) de *T. reesei*, provocaba una reducción en su expresión (Zeilinger y col., 2001). No obstante, no existen estudios sobre la importancia de estos motivos CCAAT en la región promotora de genes que codifican endoPGs.

También se encontraron tres secuencias 5'-HGATAR-3', a la que se unen factores de transcripción como AreA o Nit2, relacionados con el metabolismo del nitrógeno, en *A. nidulans* y *N. crassa*, respectivamente (Ravagnani y col., 1997), y que regulan la utilización de ese compuesto en respuesta a los niveles extracelulares de glutamina. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio de expresión de *Thpg1* no permiten determinar si las condiciones con déficit de nitrógeno participan en la regulación de la expresión del gen.

Otra secuencia localizada en el promotor de *Thpg1* fue CCCTGA, presente en los promotores de muchos genes pectinolíticos y que podría participar en su regulación. A pesar de que no se ha estudiado en detalle su función, se cree que esta secuencia, está implicada en la activación de endoPGs de *A. niger* (De Vries y col., 2002).

Otros dos elementos *cis* localizados en el promotor del gen *Thpg1* fueron la secuencia consenso 5'-CATTCY-3', de unión del factor AbaA, que pertenece a la

familia de motivos TEA/ATTS (Adrianopoulos y Timberlake, 1994), y la secuencia consenso 5'-WN_(1,2)AAN_(1,2)A-3', de unión del factor Ste12 (Mead y col., 2002). El estudio del promotor de la endoPG *Clpg2* de *C. lindemuthianum* reveló la presencia de estos dos elementos *cis* dispuestos en tandem, que parecen estar implicados en el crecimiento del hongo, tanto en condiciones saprofiticas en un medio con pectina, como en condiciones de patogénesis, durante el desarrollo del apresorio (Herbert y col., 2002). A pesar de que estas dos secuencias no se localizaron en tandem en el promotor de *Thpg1*, no disponemos de datos para valorar hasta que punto puede ser importante esta disposición.

Otro factor a tener en cuenta en los estudios expresión de *Thpg1* es el tiempo de inducción del gen. En el caso de hongos patógenos que presentan familias de endoPGs, es evidente que la expresión de sus genes es diferencial en el tiempo, es decir, el organismo produciría las endoPGs de manera secuencial, adaptándose a las condiciones del medio (Cotton y col., 2003; Li y col., 2004). Así, por ejemplo, la endoPG de *C. lindemuthianum*, *CLPG1*, se expresa a las 12 horas en un medio con pectina como fuente de carbono, siendo funcional durante la etapa saprofítica del hongo (Centis y col., 1997). Por otro lado, la familia de genes de endoPGs de *B. cinerea* se expresan en hojas de judía dentro de las primeras 24 horas post-inoculación, pero en hojas de tomate hay endoPGs que se expresan a las 120 horas post-inoculación (ten Have y col., 2001). El nivel más alto de expresión observado en *Thpg1* ocurrió tras 24 horas de crecimiento del hongo en presencia de pectina al 0,5%, tiempo bastante largo si consideramos que *Trichoderma* es un hongo saprofito y que estas enzimas deberían abrir camino a otras en el proceso de degradación del material vegetal.

Está claro que la regulación de las endoPGS es muy compleja y está sometida a más mecanismos que una simple represión por glucosa o una inducción por sustrato. La presencia de los motivos de regulación en su región promotora, anteriormente citados, apoyarían la hipótesis de que la regulación de las endoPGs estaría determinada por una compleja red de señales que se activarían en función de la etapa de vida del hongo (parasítica o saprofítica) que, a su vez, depende de las condiciones del medio. El análisis de numerosas endoPGs ha permitido determinar la especialización funcional de estas enzimas, de tal manera que algunas podrían estar destinadas a la obtención de nutrientes durante el crecimiento saprofítico, mientras que otras podrían contribuir en los procesos de patogénesis del hongo. En este sentido, la endoPG *pppg1* de *P. parasitica* se expresó mucho más en una interacción *in vivo* con plantas de tomate que en presencia de pectina al 0,1% (Yan y Liou, 2005) hecho que estaría más relacionado con procesos de patogénesis. Sin embargo, la endoPG *Thpg1* de *T. harzianum*, que mostró *in vitro* mayor expresión en pectina 0,1 ó 0,5% que en presencia de plantas de tomate, estaría más relacionada con procesos saprofíticos del hongo.

La traducción de la ORF del gen, 1143 pb, dió una secuencia de 380 aminoácidos que correspondían a una proteína de un peso molecular teórico de 38,29

kDa y un punto isoeléctrico teórico (pI) de 5,02. Estas características son similares a las observadas en las endoPGs de otros hongos (Annis y Goodwin, 1997). Se llevó a cabo un análisis *in silico* de la proteína ThPG1, que determinó una ubicación extracelular con una probabilidad de un 56%, y además se detectó un péptido señal en las posiciones 21-22, lo que estaría de acuerdo con el carácter de enzima secretada al medio tras su procesamiento y, que apoyaría, los resultados obtenidos con la enzima ThPG1 en el análisis proteómico, en el que se detecta actividad endopoligalacturonasa en varios de los sobrenadantes procedentes de cultivos de *Trichoderma* (resultados que se discutirán más adelante). En general, la presencia de péptido señal se ha relacionado con la hidrofobicidad de la proteína (Matoba y Ogrydziak, 1998). En el perfil hidropático de ThPG1 que se muestra en la Figura 18, se observa un marcado carácter hidrofóbico al principio de la secuencia aminoacídica. Se ha comprobado que la mayoría de las endoPGs se secretan como precursores, presentando una secuencia de 20 a 40 aminoácidos, cuyo tamaño depende de la presencia o no de un prepro-péptido (Annis y Goodwin, 1997). En este sentido, se han descrito tamaños de péptido señal similares al observado en ThPG1 para PpPG1 de *P. parasitica* (Yan y Liou, 2005) o PGaII de *A. niger* (Bussink y col., 1990). También hay endoPGs que presentan un prepro-péptido, una secuencia de corte entre el péptido señal y el sitio de inicio de la proteína madura, como es el caso de PGaII de *A. niger*, con un sitio de corte para proteasas de tipo tripsina en el aminoácido 27 (Bussink y col., 1990). En la secuencia de ThPG1 no se observó sitio de corte para este tipo de proteasas.

El tamaño teórico de la proteína madura ThPG1 es de 359 aminoácidos, con un peso molecular de 36,2 kDa y un pI de 4,71. Este valor estaría muy por encima de los 31 kDa obtenidos para las dos únicas isoenzimas de una endoPG de *T. harzianum*, PGI y PGII, purificadas hasta la fecha (Mohamed y col., 2006). Estos autores obtuvieron este valor de peso molecular tanto a partir de filtración en gel como de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En el presente trabajo, a pesar de que no trabajamos con la enzima ThPG1 purificada, determinamos mediante SDS-PAGE un peso molecular aproximado de 29 kDa. Por otro lado, un valor de aproximadamente 28 kDa se obtuvo a partir del proteoma (2D-SDS-PAGE) intracelular que se realizó para la interacción *T. harzianum*-tomate-patógeno. El valor de 29 kDa está más próximo a los 31 kDa obtenidos para PGI y PGII que al valor teórico de 36,2 kDa deducido tras el análisis *in silico*. Sin embargo, no deja de resultar extraño que el valor experimental sea más bajo que el obtenido para el peso molecular teórico de la proteína, ya que si nos atenemos a los datos existentes en bibliografía, los valores de peso molecular experimental suelen ser muy superiores a los teóricos debido a las modificaciones post-traduccionales. Así ocurre en las endoPGs de *Aspergillus kawachii* (Contreras-Esquivel y Voget, 2004), o la PpPG1 de *P. parasitica* que presenta un valor teórico de 39,7 kDa y un valor experimental de 48 kDa (Yan y Liou, 2005). Incluso en una exoPG de *C. carbonum* el peso molecular teórico de 48 kDa pasa a 60 kDa con los datos experimentales (Scott-Craig y col., 1998).

Particularmente, para dos isoenzimas de una endoPG de *T. reesei* (Mohamed y col., 2003), el tamaño de la proteína fue aproximadamente de 66 kDa, tanto a partir de datos SDS-PAGE como de filtración en gel, mientras que el valor teórico fue de 38,3 kD (Mohamed y col., 2003). La glicosilación explicaría perfectamente esa diferencia de tamaño en el peso de las proteínas de *T. reesei* ya que ésta provoca un aumento del tamaño molecular mayor que cualquier otra modificación post-traduccional, que sólo llegaría a los 200 Da por sitio (Xie y col., 2005). Sin embargo, resulta extraño la coincidencia en el valor obtenido a partir de dos técnicas tan dispares como SDS-PAGE, condiciones desnaturalizantes, y filtración en gel, si consideramos otros estudios realizados con otras hidrolasas de *Trichoderma* (Montero y col., 2005; Sanz y col., 2005).

Se llevó a cabo un alineamiento de ThPG1 con secuencias depositadas en bases de datos con las que esta proteína mostró un mayor nivel de similitud, siendo muchas de ellas endoPGs y endoPGs hipotéticas resultantes de proyectos de secuenciación. Se observaron las regiones conservadas de estas proteínas, descritas en bibliografía (Van Santen y col., 1999), con los residuos Asn¹⁹⁴, Asp¹⁹⁶, Asp²¹⁷, Asp²¹⁸, His²³⁹ y Gly²⁴⁰, que estarían implicados en la hidrólisis del sustrato, y los residuos Arg²⁷² y Lys²⁷⁴, que estarían implicados en la unión al sustrato. Tras el alineamiento, la mayor variabilidad entre endoPGs, se observó en la región correspondiente al péptido señal.

Por otro lado, el análisis *in silico* de la topología de ThPG1 determinó la presencia de un dominio glicosílico que se extendía desde la posición 59 hasta el final de la proteína. Las endoPGs pertenecen a la familia 28 de las glicosil hidrolasas que muestran una estructura típica en hélice β paralela dextrógira, característica de las enzimas que degradan la pectina (Herron y col., 2000). A partir del análisis de endoPGs cristalizadas, como la PGaII de *A. niger*, se ha determinado que la hélice β se compone de cuatro láminas β paralelas (van Santen y col., 1999). Esta disposición coincide con los resultados obtenidos en el análisis *in silico* de la estructura secundaria de ThPG1 en la que predominan las láminas β frente a tres hélices α , dos de ellas localizadas en el extremo amino-terminal (Figura 19). Además, el modelo tridimensional obtenido para la proteína ThPG1 se ajusta a los obtenidos para otras endoPGs (Pickersgill y col., 1998; van Santen y col., 1999; Federici y col., 2001; Bonivento y col., 2008). Una comparación de la estructura terciaria de ThPG1 con la estructura cristalizada de la endoPG de *Colletotrichum lupini* (2iQ7_A) mostró una similitud del 54,4% (Figura 21), presentando la típica disposición en hélice β (en amarillo), aunque no se puedan apreciar las cuatro láminas y los diez giros completos que forman, y los aminoácidos que constituyen el centro catalítico situados en la hendidura que se forma en la parte exterior de la hélice β (línea roja).

Para determinar la relación de *Thpg1* con otros genes que codifican endoPGs y que están depositados en bases de datos, se realizó un análisis filogenético. Inicialmente, la secuencia *Thpg1* se alineó con las secuencias de otros genes que

codifican endoPGs y endoPGs hipotéticas de hongos ascomicetos y basidiomicetos, de plantas y de un oomiceto. También se incluyó la secuencia de un gen que codifica para una exoPG hipotética de *T. reesei*. En el árbol *neighbour-joining*, basado en distancias, *Thpg1* se localizó junto a una endoPG hipotética de *T. virens*, formando un subgrupo soportado por una estabilidad *bootstrap* del 100%. El conjunto de secuencias se agruparon de un modo similar al observado en un estudio realizado con 115 PGs (Markovic y Janecek, 2001), donde el agrupamiento reflejaba las relaciones evolutivas de los diferentes grupos de organismos. De esta manera, quedaban separados basidiomicetos, ascomicetos, plantas y oomicetos. Particularmente, la secuencia del gen que codifica la exoPG hipotética quedó separada del resto de endoPGs y más próxima al grupo de las plantas. Esta ubicación podría ser demostrativa del diferente papel biológico de estas enzimas respecto a las endoPGs fúngicas.

Con objeto de conocer el número de copias de *Thpg1* en el genoma de *T. harzianum* T34, a la vez que explorar la presencia de genes homólogos en otras especies de *Trichoderma* representantes de la diversidad genética existente en este género, se realizó un análisis tipo *Southern*. Se incluyeron en el estudio cepas de especies relacionadas con el biocontrol como *T. asperellum* (T25), *T. atroviride* (T11), *T. harzianum* (T22 y T34) y *T. virens* (T59), así como, una cepa de *T. longibrachitum* (T52) no relacionada con el control biológico (Hermosa y col., 2004). Para el análisis se utilizaron dos enzimas de restricción diferentes, *Bam*HI, con un sitio de corte en la secuencia de *Thpg1*, y *Xho*I, sin diana en el gen. El patrón de bandas de hibridación observado en la cepa T34 indicó que el gen se encuentra como copia única. En este sentido, se ha descrito que *Fusarium moniliforme* presenta una copia única de un gen que codifica una endoPG (Caprari y col., 1993), aunque la mayoría de los hongos contienen familias multigénicas en su genoma (Fraissinet-Tachet y col., 1995; Wubben y col., 1999; Götesson y col., 2002). En las condiciones restrictivas en las que se realizó la hibridación (65°C) también se observó una señal en los carriles que contenían ADN digerido con *Xho*I o *Bam*HI de las cepas T11, T22, T25 y T59, pero no se observó señal en el ADN de T52 digerido con *Bam*HI. Considerando la banda observada en el carril que contenía el ADN de T52 digerido con *Xho*I y la presencia de un gen homólogo en el genoma, disponible *on line*, de *T. reesei* que es una especie filogenéticamente muy próxima a *T. longibrachiatum* (T52), parece lógico pensar que la ausencia de banda en el carril que contenía el ADN digerido con *Bam*HI sea debido a la degradación, y que la banda que aparece al digerir con *Xho*I sea por la presencia de un gen homólogo en T52.

En estos momentos, los genomas de algunas cepas de las especies *T. reesei*, *T. virens* y *T. atroviride* están disponibles *on line*. Se realizaron análisis tipo BlastX con la secuencia del gen *Thpg1* en esas bases de datos. En *T. virens* aparecieron tres secuencias que presentaron homología con el gen *Thpg1*: una secuencia de 1380 pb que contenía 4 intrones y una homología del 84%; otra secuencia con un tamaño de 1087 pb y un único intrón, dió una homología del 56% con *Thpg1* y del 71% con una endoPG del hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* (*Clpg1*); y, una secuencia de 1595 pb, con cuatro

intrones, que mostró homología con una exoPG de *F. oxysporum*. En *T. reesei*, dos secuencias mostraron homología con *Thpg1*: una de 1381 pb y 4 intrones dió un 85%, y otra de 1218 pb dió un 43%. Por último, en *T. atroviride*, aparecieron 5 secuencias con tamaños comprendidos entre 1100 y 1600 pb, conteniendo entre 1 y 6 intrones, y homologías entre 78 y 91%. Se realizó un alineamiento con todas estas secuencias (datos no mostrados), la secuencia de *Thpg1*, y el resto de secuencias utilizadas en el estudio filogenético cuyos resultados aparecen en la Figura 22. El árbol NJ mostró que tres secuencias de aproximadamente 1300 pb y con 4 intrones, una de *T. virens*, una de *T. atroviride* y una de *T. reesei*, quedaban agrupadas con el gen *Thpg1* de *T. harzianum* con un valor *bootstrap* de 100. Dos secuencias, una de *T. virens* y otra de *T. atroviride*, de unos 1100 pb que contenían sólo un intrón se agruparon juntas, con un valor *bootstrap* de 100, y se situaron más próximas a la secuencia de *F. oxysporum* que a *Thpg1*. Dos secuencias de *T. atroviride* y una de *T. virens* se agruparon con la del gen que codifica una exoPG hipotética de *T. reesei*. Sin embargo, dos secuencias, una de *T. reesei* y otra de *T. atroviride*, que presentaron homología con genes que codifican exoPGs quedaron localizadas entre las endoPGs fúngicas y las de plantas.

Teniendo en cuenta que habíamos detectado, mediante un análisis *Southern*, que *Thpg1* se encuentra en copia única en el genoma de *T. harzianum* T34, y considerando el número de secuencias que mostraron homología con *Thpg1* en las especies de *Trichoderma* cuyos genomas están disponibles *on line*, podríamos pensar que hay una única copia para el gen que codifica la endoPG en *T. reesei* y de dos genes en el caso de *T. virens* y *T. atroviride*. Si además consideramos que en el ADN de cepas de estas dos últimas especies se observó una única banda de hibridación en el *Southern*, realizado bajo condiciones restrictivas y usando como sonda el gen *Thpg1*, estaríamos en condiciones de deducir que sólo un gen homólogo a *Thpg1* y en copia única estaría presente en el genoma de las especies *T. virens* y *T. atroviride*. Sin embargo, la presencia en los genomas de estas dos especies de dos secuencias con alta homología con *Thpg1* indicaría la existencia de, al menos, otro gen que codifica una endoPG en esas cepas.

Por otro lado, dos isoenzimas endoPG se han purificado en *T. reesei* (Mohamed y col., 2003), este resultado tomado junto a los ya discutidos anteriormente, nos llevaría a pensar que la existencia de esas dos isoenzimas es debida a modificaciones post-traduccionales y no a la presencia de dos genes que codifican endoPGs. También se han purificado dos isoenzimas en *T. harzianum* (Mohamed y col., 2006), por lo que podríamos llegar a la misma conclusión que con *T. reesei* para el gen *Thpg1*.

Con el fin de determinar una actividad endopoligalacturonasa se utilizaron los sobrenadantes recogidos tras incubar la cepa T34 en aquellas condiciones de cultivo en las que se había observado expresión del gen *Thpg1*. Inicialmente, las muestras se dializaron para descartar los restos de sales del medio de cultivo, así como para eliminar los restos de azúcares o moléculas de tamaño inferior a 10 kDa producidas durante el

crecimiento del hongo, que podrían interferir en la detección de la actividad. Puesto que no disponíamos de la enzima purificada y que son numerosas las enzimas que pueden actuar sobre la pectina (Willats y col., 2001), necesitábamos aplicar un método que nos permitiera descartar la acción de otras enzimas con actividad pectinasa. Para ello, utilizamos como sustrato PGA de naranjo no esterificado (ácido péctico), de tal manera que restringimos la actividad a enzimas exo, endoPGs y pectato liasas, aunque estas últimas requieren el ión calcio para actuar por lo que su acción se vería limitada por la presencia o no de las “cajas de huevo” en el sustrato utilizado (Herron y col., 2003).

En un primer ensayo de actividad realizado en un medio sólido conteniendo PGA al 0,2%, los extractos dializados de *T. harzianum* T34, crecido durante 24 horas en MM sin glucosa y suplementado con pectina al 0,5%, producían un halo de lisis. Esta condición de crecimiento del hongo era, a su vez, la que producía mayores niveles de expresión del gen. Este ensayo en el que los resultados se leen como halos de lisis se usó en otros trabajos para medir la actividad endopoligalacturonasa (Scott-Craig y col., 1990; Gognies y col., 1999). Los halos observados con los extractos de la cepa T34 crecida en las condiciones arriba mencionadas nos permiten confirmar la naturaleza endopoligalacturonásica de esta enzima, aunque no debemos olvidar que al trabajar con un extracto proteico crudo habrá otras pectinasas, como las exoPGs o las pectato liasas, que estarán contribuyendo también a esa actividad. El resto de sobrenadantes obtenidos tras crecer la cepa T34 en condiciones donde se observó expresión de *Thpg1*, no produjeron halos de lisis en este ensayo. La falta de correlación entre expresión y actividad no sería tal, considerando que el nivel de expresión del gen en el cultivo de la cepa T34 en un medio con pectina al 0,5% fue casi cuatro veces superior al nivel observado en un medio que contenía PGA al 0,5%, pudiendo deberse a que la acumulación de la proteína en esas condiciones de crecimiento no era suficiente como para poder detectarla en este ensayo.

En los sobrenadantes utilizados en el ensayo de halos de lisis, se analizó la actividad específica, utilizando también PGA como sustrato. De igual manera, solamente se detectó actividad específica cuando el hongo se cultivó durante 24 horas en un MM, sin glucosa, suplementado con pectina al 0,5% (5,08 U/mg). En una muestra obtenida tras cultivar la cepa T34 en las condiciones antes mencionadas pero durante 36 horas se detectó una actividad específica de 3,38 U/mg. Este último resultado, nos hace suponer que el pico más alto de expresión del gen *Thpg1* se produciría tras 24 horas de incubación.

Si suponemos la presencia en el genoma de *T. harzianum* T34 de otras endoPGs, exoPGs o pectato liasas con capacidad para hidrolizar PGA, la duda que se plantea, considerando los resultados obtenidos en los dos ensayos de actividad realizados, es ¿por qué no se detecta actividad en otras condiciones de crecimiento del hongo usadas en el estudio?. Una posible explicación sería que las condiciones utilizadas en estos ensayos (sustrato y tiempo) no fueran las adecuadas para la expresión de estos genes.

Una vez analizada la expresión del gen *Thpg1* en un sistema *in vitro*, se abordó su estudio en un sistema de interacción *in vivo* con tres componentes: *Trichoderma*-planta-patógeno. Previamente, habíamos observado que el nivel de expresión de *Thpg1*, tras crecer el hongo *in vitro* con planta de tomate al 1%, era relativamente bajo, por lo que no resultó sorprendente que la señal observada en el análisis tipo *Northern* del sistema de tres componentes, fuera tan baja (se detectó señal después de una exposición de más de 72 horas). No obstante, la expresión del gen fue mayor cuando había un patógeno en el sistema (Figura 27) y, particularmente, con un patógeno de raíz como el oomiceto *P. ultimum*. El hecho de que se detectara más expresión en las dos condiciones en las que un patógeno estaba presente que en la condición control (planta de tomate-*Trichoderma*), puede ser indicativo de que de alguna manera los patógenos estarían afectando a la expresión del gen *Thpg1*.

Por un lado, podría pensarse que las pectinasas de los patógenos estarían metabolizando la pectina de la planta y, a su vez, los compuestos liberados actuarían como inductores de la expresión de *Thpg1* en mayor grado que con la planta sola. Y por otro, que fuera el propio patógeno el que indujera la expresión del gen *Thpg1*. No obstante, en este último supuesto no se detectaron secuencias relacionadas con micoparasitismo en la región promotora del gen y en la pared de los patógenos no habría componentes que pudieran inducir a nivel de sustrato la expresión de una endoPG.

Una de las herramientas desarrolladas dentro del proyecto *TrichoEST*, para el análisis de la función génica, fue la puesta a punto del análisis proteómico en sistemas de dos y tres componentes (Suárez y col., 2005; Marra y col., 2006; Seidl y col., 2006). Con esta metodología disponible, se decidió comprobar los resultados obtenidos en el análisis *Northern* desde el punto de vista proteómico, a la vez que obtendríamos una visión global del proteoma de *T. harzianum* T34 en un sistema de tres componentes: *Trichoderma*-planta-patógeno. El estudio se completó con la introducción en el sistema de un patógeno foliar, como es *B. cinerea*, para comprobar si la mayor expresión detectada en el *Northern* para los patógenos de raíz, guardaba relación con el análisis proteómico o, por el contrario, se trataba de una respuesta independiente del modelo de patosistema, rizosfera o filoplano, elegido para realizar el ensayo.

Un total de 360 *spots* diferenciales se obtuvieron en el proteoma de *T. harzianum* T34 cuando estuvo en contacto con la planta de tomate y cada uno de los tres patógenos (datos no mostrados). Con respecto a los patógenos de raíz, *R. solani* y *P. ultimum*, el proteoma de la cepa T34 generó 101-105 *spots up-regulated* y 10-17 *spots down-regulated*. Por el contrario, el patógeno foliar, *B. cinerea*, sólo produjo 46 *spots up-regulated*, pero llegó a alcanzar los 26 *spots down-regulated*. Estos datos son indicativos de que el proteoma de *Trichoderma* sufre mayores cambios cuando los patógenos de raíz interactúan con la planta. Uno de los *spots* que apareció *up-*

regulated, fue el 0303, precisamente el correspondiente a la EST 10663. Este *spot* mostró más intensidad de señal en un sistema de tres componentes, presencia del hongo patógeno, la planta y la cepa T34 de *T. harzianum*, que cuando se trataba de un sistema de dos componentes, planta-cepa T34. También, se detectó mayor señal en presencia de los dos patógenos de raíz, siendo a su vez, el valor 2,1 veces mayor para *R. solani*. Los resultados obtenidos no fueron exactamente coincidentes con los obtenidos en el *Northern*, tal vez, por trabajar por dos vías de análisis diferentes, proteínas y mensajeros.

A pesar de que los resultados obtenidos en ambos análisis (proteoma y Northern) con relación a los patógenos *R. solani* y *P. ultimum*, no fueron coincidentes sobre quién producía una mayor expresión del gen, si reflejarían la importancia que tiene la presencia de un patógeno en la expresión de *Thpg1*.

Los datos discutidos en este capítulo indicarían que ThPG1 de *T. harzianum* T34 está relacionada directamente con la utilización de material vegetal en su crecimiento saprofítico. Por otro lado, la obtención y análisis de mutantes silenciados (resultados y discusión en los Capítulos 2 y 3), así como de plantas que sobreexpresan *Thpg1* (resultados y discusión en el Capítulo 4), han permitido profundizar en el estudio de la relación de este gen con la planta.

**Capítulo 2: SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN
DEL GEN *Thpg1* EN *T. harzianum* T34**

RESULTADOS

1. TRABAJO PREVIO

El método utilizado para analizar funcionalmente el gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34 fue el silenciamiento génico por interferencia de ARN. Para ello, se utilizó el plásmido pSIL proporcionado por la Dra. Sonia Sousa de la Universidad de Sevilla, quien demostró que este tipo de construcciones que codifican horquillas de ARN autocomplementarias (*self-complementary hairpin RNA* ó *hpRNA*) podían ser una alternativa eficaz en aquellos organismos en los que resulta difícil la obtención de mutantes nulos mediante interrupción génica, como es el caso de *T. harzianum* T34.

2. OBTENCIÓN DE CEPAS DE *T. harzianum* T34 QUE SILENCIAN EL GEN *Thpg1*

Para obtener cepas de *T. harzianum* T34 que silencian el gen que codifica la proteína ThPG1 de esta misma cepa, se llevó a cabo una transformación homóloga con el plásmido pJL43b1-*Thpg1*. De manera resumida, se utilizó el plásmido pSIL para clonar, en orientaciones invertidas, un fragmento del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34. El *cassette* de expresión de este plásmido se clonó en el vector pJL43b1 para transformar los protoplastos. El proceso detallado de construcción de este plásmido se recoge en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos.

El protocolo de obtención de protoplastos y permeabilización de los mismos (Cardoza y col., 2006b) se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. En la transformación se utilizaron 10 µg del vector, previamente linearizado con *KpnI* para facilitar su integración en el genoma del hongo. Los 16 transformantes obtenidos se confirmaron tras sucesivas rondas de crecimiento, en medio TSA selectivo (200µg/mL de fleomicina) y no selectivo. Finalmente, se seleccionaron nueve transformantes para estudios posteriores.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS TRANSFORMADAS CON pJL43b1-*Thpg1*

3.1. Comprobación y selección de los transformantes

En primer lugar, se analizó la integración del vector pJL43b1-*Thpg1* en el genoma de *T. harzianum* T34. Para ello, se extrajo ADN genómico de la cepa T34 y de nueve transformantes, denominados ePG1 hasta ePG9, y se realizó una PCR para comprobar si llevaban el *cassette* de expresión. Se utilizaron los oligonucleótidos Int-F y Tcbh2, que amplificaron un fragmento de 1239 pb correspondiente a: parte del intrón, fragmento invertido del gen *Thpg1* y parte del terminador del gen de la celobiohidrolasa 2 (*cbh2*) de *T. reesei* T59. La PCR resultó positiva para siete de los nueve transformantes (Figura 29).

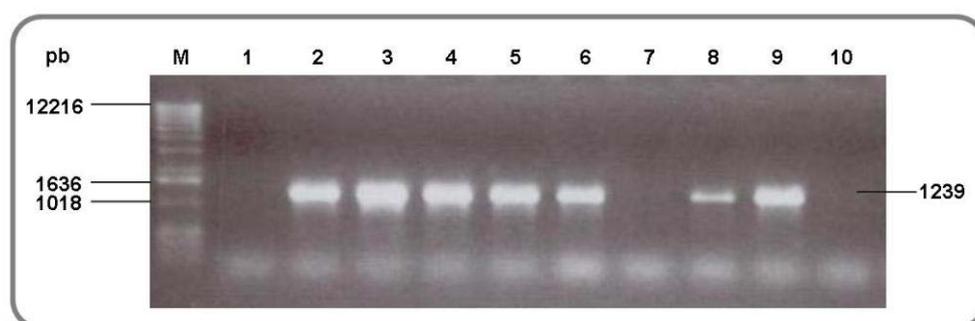


Figura 29. Productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones de ADN genómico de *T. harzianum* T34 (carril 10) y de nueve cepas transformantes (carriles 1 al 9) con los oligos IntF y Tcbh2: M: marcador X DNA ladder (Roche).

Un criterio para reducir el número de transformantes con los que llevar a cabo los siguientes estudios, fue analizar su comportamiento frente a *R. solani* en cultivo dual. En este ensayo solo el transformante ePG8 mostró, en un análisis visual, un crecimiento diferencial con respecto a la cepa silvestre T34. Además de este transformante se seleccionaron otros tres que no mostraron diferencias.

Con los cuatro transformantes seleccionados se realizó un estudio de la actividad endopoligalacturonasa, como se indica en el apartado 12.4.2 de Materiales y Métodos, para determinar el grado de silenciamiento de estos transformantes. Para ello, se cultivaron los transformantes ePG4, ePG5, ePG6 y ePG8 y la cepa silvestre *T. harzianum* T34 en un MM (Penttilä y col., 1987) suplementado con pectina al 0,5%, por ser esta la condición en la que se había detectado mayor expresión del gen *Thpg1*.

Como se muestra en la Figura 30 la actividad endopoligalacturonasa se vio claramente reducida en los cuatro transformantes seleccionados, obteniéndose la menor actividad específica en el transformante ePG5, con una disminución de un 91,14%, respecto a la cepa silvestre T34.

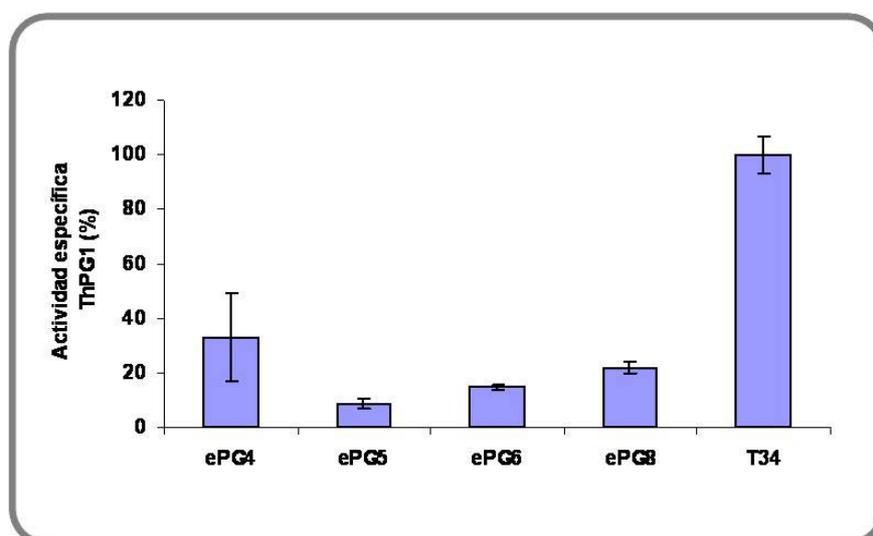


Figura 30. Actividad endopoligalacturonasa específica (U/mg proteína total) analizada en los sobrenadantes de la cepa silvestre T34 y los transformantes silenciados ePG4, ePG5, ePG6 y ePG8, después de 24 horas de crecimiento en un MM (Penttilä y col., 1987) suplementado con pectina al 0,5%. Cada valor es la media de tres medidas \pm la desviación estándar.

Los transformantes ePG5, ePG6 y ePG8, al presentar los niveles más bajos de actividad endopoligalacturonasa, se seleccionaron para posteriores estudios.

3.2. Confirmación de los transformantes: análisis tipo *Southern*

Una vez seleccionadas las cepas transformadas con las que se iba a realizar el resto de estudios, se realizó un análisis tipo *Southern* para conocer el número de copias que se había integrado en el genoma de las cepas transformadas. Se digirieron 10 μ g de ADN de cada cepa con *SacI*, que corta dos veces en el vector de expresión, liberando un fragmento de 3 kb, además en la secuencia de *Thpg1* no existe diana para esta enzima. Se usó como sonda la secuencia completa del gen *Thpg1*, marcada radiactivamente con 32 P. Se confirmó que esas tres cepas eran transformantes y que junto a la banda correspondiente al gen endógeno de la cepa *T. harzianum* T34, se había integrado una sola vez el *cassette* de transformación (Figura 31). En el transformante ePG8 apareció una banda adicional de aproximadamente 2,5 Kb que podría corresponder a una integración truncada del *cassette* de expresión.

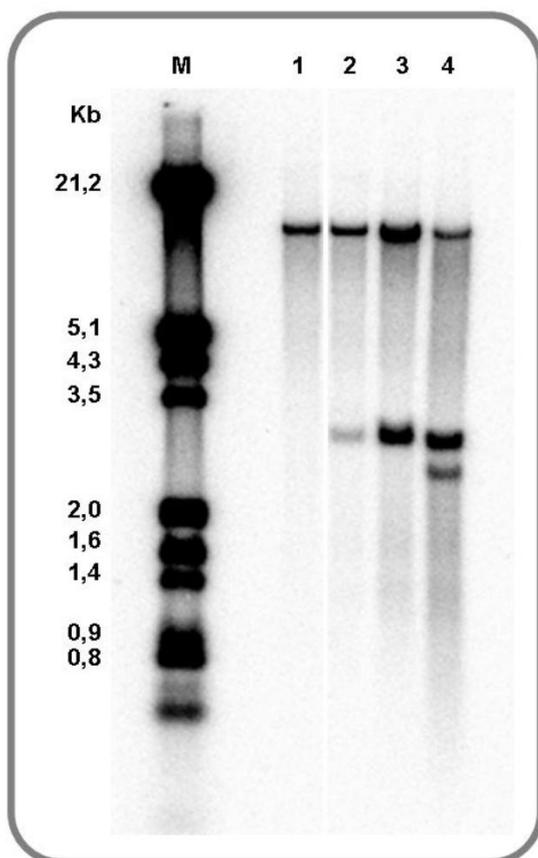


Figura 31. Análisis tipo *Southern* del gen *Thpg1* en *T. harzianum* T34 (1) y en los transformantes ePG5 (2), ePG6 (3) y ePG8 (4). El ADN genómico fue digerido con *SacI*, la hibridación se realizó en condiciones restrictivas y como sonda se utilizó la secuencia completa del gen *Thpg1*. M: marcador λ *HindIII*.

3.3. Análisis de la expresión de *Thpg1* en los transformantes seleccionados

El siguiente objetivo fue conocer si la introducción de la horquilla del fragmento de *Thpg1* autocomentaria en el genoma de *T. harzianum* T34, daba lugar a una disminución en la expresión del gen *Thpg1*, y con ello, confirmaría el resultado obtenido en el ensayo de actividad realizado anteriormente. Para ello, se realizó una *Real-time* PCR (como se indica en el apartado 10.3.5 de Materiales y Métodos) con el ARN total que se extrajo de micelios obtenidos tras cultivar la cepa silvestre T34 y los tres transformantes silenciados, en la condición de crecimiento que más expresión del gen *Thpg1* se había detectado: MM (Penttilä y col., 1987), sin glucosa, suplementado con pectina al 0,5% y durante 24 horas.

El ARN total se retrotranscribió utilizando oligo(dT)₁₅ (como se indica en el apartado 10.3.4. de Materiales y Métodos). El ADNc así generado se utilizó como molde en diferentes reacciones de PCR. Los oligonucleótidos endop-1 y endop-5, utilizados para comprobar el silenciamiento del gen *Thpg1*, se diseñaron sobre una zona que no había sido utilizada en la construcción del plásmido pJL43b1-*Thpg1*. Como control interno se utilizó el gen de la β -actina, usando los oligonucleótidos act-1 y act-2. La especificidad de los productos de PCR se confirmó mediante electroforesis en un

gel de agarosa, obteniéndose un fragmento de 425 pb para el gen *Thpg1*, y de 407 pb para el gen de la β -actina.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de *crossin points* (CP) y de eficacia de la *Real Time* (*E*), junto con los niveles de expresión relativa de los genes *Thpg1* y β -actina en la cepa T34 y tres transformantes silenciados en el gen *Thpg1* (ePG5, ePG6 y ePG8).

	CP		<i>E</i>		Ratio ^a
	<i>Thpg1</i>	β -actina	<i>Thpg1</i>	β -actina	
T34	28,55 ± 0,02	27,42 ± 0,07	1,68 ± 0,04	1,75 ± 0,10	—
ePG5	36,96 ± 0,97	27,06 ± 0,12	1,84 ± 0,00	1,76 ± 0,00	0,006 ± 0,003 ^b
ePG6	39,01 ± 0,26	24,85 ± 0,64	2,12 ± 0,03	1,76 ± 0,06	0,010 ± 0,005 ^b
ePG8	33,49 ± 0,80	26,83 ± 0,62	1,64 ± 0,13	1,79 ± 0,07	0,071 ± 0,029 ^b

^a Ratio = $(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control-sample})}$

^b Valores obtenidos a partir de los datos CP y *E* de los transformantes silenciados y la cepa T34

Los transformantes ePG5, ePG6 y ePG8 analizados, mostraron niveles de expresión, en el gen *Thpg1*, menores que los obtenidos para la cepa silvestre T34 siendo 167, 100 y 14 veces inferiores, respectivamente.

3.4. Ensayos de crecimiento en placa

Con objeto de analizar si el silenciamiento del gen *Thpg1* afectaba a su capacidad de crecimiento en un medio con pectina, se realizó un ensayo de crecimiento en placa, tal y como se describe en el apartado 13.1 de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 32.

El crecimiento de *T. harzianum* T34 y el silenciado ePG5 fue similar tanto en el medio control de PDA, como en el MM con glucosa al 0%. En cambio, en el MM suplementado con pectina al 0,5% se observó un menor crecimiento del transformante silenciado. Esta diferencia fue estadísticamente significativa después de analizar los datos mediante el test de Fisher.

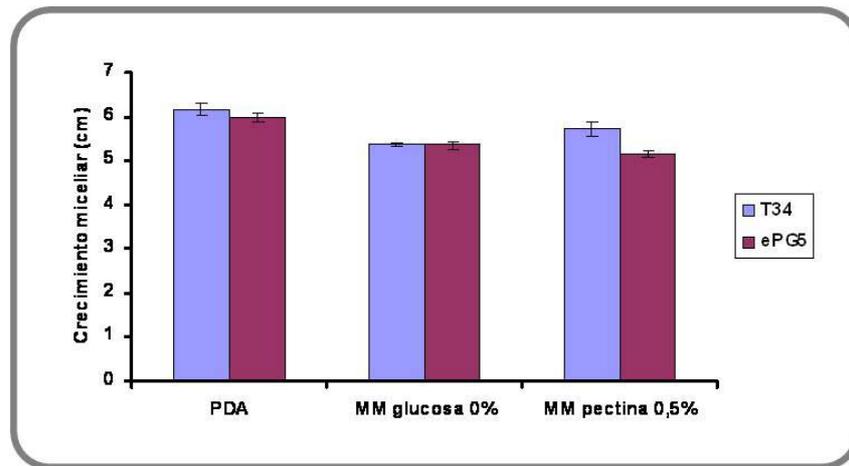


Figura 32. Crecimiento de la cepa silvestre *T. harzianum* T34 y el silenciado ePG5 en un MM suplementado con pectina al 0,5%. Como controles se utilizó el crecimiento de ambas cepas en los medios PDA y MM, sin glucosa, (Penttilä y col., 1987). Cada valor es la media de tres medidas \pm la desviación estándar.

DISCUSIÓN

El silenciamiento génico por interferencia de ARN ha experimentado un gran desarrollo desde su primera descripción, a principios de los años noventa, en diferentes organismos eucariotas (Napoli y col., 1990; Romano y Macino, 1992), convirtiéndose en una alternativa real para el análisis funcional de genes en aquellos organismos en los que resulta difícil la obtención de mutantes nulos mediante interrupción génica.

Además de *N. crassa*, que constituye el hongo modelo en el que se han analizado los mecanismos genéticos y bioquímicos de este fenómeno, otros estudios se han basado principalmente en patógenos, ya sea de plantas como *M. oryzae* (Kadotani y col., 2003) y *Venturia inaequalis* (Fitzgerald y col., 2004) o de humanos como *C. neoformans* (Liu y col., 2002) y *A. fumigatus* (Mouyna y col., 2004). En estos estudios se ha demostrado la existencia de interferencia por ARN y su eficacia en la obtención de mutantes con menor expresión génica.

Con objeto de asignar función al gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34 se obtuvieron transformantes en los que este gen estaba silenciado. Aunque la forma más adecuada para asignar función a un gen pasa por la disrupción génica, en *Trichoderma*, la frecuencia de recombinación homóloga es muy baja y además varía según la cepa (Mach y Zeilinger, 1998). Hasta el día de hoy, hay referencias de interrupción génica en las especies de *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* y *T. reesei*. En todos los trabajos se utilizó una extensa región de ADN genómico (más allá de la zona codificante por ambos extremos) para favorecer la recombinación homóloga del *cassette* de interrupción en el *locus* de destino (Zeilinger, 2004; Rosado y col., 2007; Rubio, 2007).

El estudio de la función de genes que codifican endoPGs se ha abordado a través de mutantes *knock-out* en *M. oryzae*, *Xylella fastidiosa* o *F. oxysporum* (García-Maceira y col., 2001; Roper y col., 2007; Mori y col., 2008). Por contra, no hay referencias sobre el silenciamiento de genes que codifican endoPGs fúngicas, si bien, ha sido descrito el silenciamiento del gen que codifica una PG de tomate en el que se obtuvo una reducción de los niveles de transcrito del 98% (Brummell y col., 2003). Debido a la baja frecuencia de recombinación homóloga en *Trichoderma* optamos, para asignar función a *Thpg1*, por la obtención de cepas transformantes de *T. harzianum* T34 silenciadas en este gen. Se ha demostrado el potencial de ciertas construcciones que codifican horquillas de ARN autocomplementarias (*self-complementary hairpin RNA* o *hpRNA*) en el silenciamiento eficaz de genes en plantas (Wesley y col., 2001). Este método ha sido aplicado con éxito para silenciar genes de *Trichoderma* (Sousa, 2004; Cardoza y col., 2006) y de hongos patógenos como *Aspergillus* y *Fusarium* (McDonald y col., 2005). En este sentido, la cepa *T. harzianum* T34 fue transformada con el plásmido

pJL43b1-*Thpg1* que utiliza este tipo de sistema de horquillas de ARN autocomplementarias.

El proceso de transformación estuvo mediado por protoplastos (Cardoza y col., 2006) y se utilizó un fragmento de 440 pb del gen *Thpg1* bajo el control del promotor constitutivo del gen *ta* de *T. harzianum* (Sousa, 2004). Tras analizar la inserción del *cassette* de expresión en siete transformantes mediante PCR (ePG1, ePG2, ePG3, ePG4, ePG5, ePG6 y ePG8), se realizó un primer análisis para seleccionar un menor número de transformantes con los que seguir trabajando. Para ello, se realizó un ensayo de enfrentamiento dual entre la cepa silvestre T34 y cada uno de los transformantes seleccionados por PCR, y el patógeno *R. solani*. A pesar de que fue el transformante ePG8, con un menor crecimiento y una menor esporulación, el que controlaba menos al patógeno, no fue ese transformante el que mostró los menores niveles de actividad endopoligalacturonasa en ensayos posteriores. Por tanto, los resultados obtenidos en este tipo de ensayo de antagonismo no fueron determinantes a la hora de seleccionar uno o dos transformantes, para posteriores estudios, por lo que se optó por continuar con ePG8 y otros tres transformantes más (ePG4, ePG5 y ePG6).

Se midió la actividad endopoligalacturonasa de la cepa silvestre T34 y de los transformantes seleccionados (ePG4, 5, 6 y ePG8), para determinar el grado de silenciamiento del gen *Thpg1* en los mismos. Se observó una disminución de la actividad de ThPG1 en los cuatro transformantes, teniendo la menor actividad específica (U/mg proteína total), el transformante ePG5, que fue un 91,14% inferior a la de la cepa silvestre T34. Podría resultar sorprendente este grado de silenciamiento, si pensamos en la presencia de otras pectinasas, pero debemos tener en cuenta que se utilizó PGA como sustrato para restringir la acción de algunas de ellas. Aún así, resulta un nivel de silenciamiento alto si consideramos que en estudios realizados con el doble mutante *knock out* en una endoPG y una exoPG en *C. carbonum*, se detectó actividad poligalacturonasa residual posiblemente por la presencia de otros genes que codifican PGs (Scott-Craig y col., 1998).

Para comprobar el número de copias de inserción del *cassette* se realizó un análisis *Southern*, y así poder relacionar este número con el grado de silenciamiento obtenido en el ensayo de actividad. Se confirmó que la mayoría de las cepas seleccionadas poseían junto con el gen endógeno, al menos, una copia adicional del gen. Puesto que utilizamos una enzima que cortaba el *cassette* de expresión con un tamaño de 3 kb, no podemos determinar el número de copias introducidas en el genoma de *T. harzianum* T34. No obstante, la diferencia en la intensidad de señal observada para los tres transformantes permitiría pensar en la inserción de un número distinto de copias para cada uno de ellos, lo que determinaría el diferente grado de silenciamiento obtenido en el ensayo de actividad. Teniendo en cuenta este hecho, si comparamos los transformantes ePG8 y ePG5, éste último mostró menor intensidad de señal en el análisis *Southern*, pero presentó menores niveles de actividad endopoligalacturonasa.

Esta falta de correlación entre el modelo de inserción del cassette y la actividad en los transformantes ha sido descrita en transformantes que sobreexpresan distintos genes de *Trichoderma* (Limón y col., 1999; Montero-Barrientos y col., 2007).

A la vista de los resultados obtenidos en el ensayo de actividad, parecía que los niveles de expresión de *Thpg1* debían seguir la misma pauta. Se llevó a cabo una cuantificación, mediante *Real-time*, de los niveles de transcrito en la cepa T34 y tres de los transformantes silenciados y, a tenor de los resultados de este análisis, el mayor nivel de silenciamiento de *Thpg1* ocurría en el transformante ePG5. Estos resultados se correlacionaban con los obtenidos en el estudio de actividad, es decir, a mayor grado de silenciamiento del gen *Thpg1* menor actividad endopoligalacturonasa en la cepa silenciada.

Por otro lado, no se observaron diferencias fenotípicas entre las cepas T34 y ePG5. Así, el silenciamiento del gen *Thpg1* no parecía afectar ni al crecimiento, ni al grado de esporulación de la cepa cuando las comparaciones se realizaban tras crecer los hongos en un medio de crecimiento general. Con objeto de determinar si ese silenciamiento podría afectar al comportamiento del hongo en un medio más selectivo, ya que se trataba de un gen que tras su caracterización se comprobó que estaba relacionado con hidrólisis de material vegetal, se simuló esta condición utilizando un medio de crecimiento mínimo y añadiendo pectina como única fuente de carbono. Se comparó el crecimiento de la cepa silvestre T34 y del transformante ePG5, que había presentado el mayor nivel de silenciamiento, en tres medios diferentes; los medios PDA y MM sin glucosa, que se utilizaron como control, y el medio MM suplementado con pectina. Solamente en el medio que contenía pectina al 0,5% se observaron diferencias significativas de crecimiento entre ambas cepas, siendo en el transformante un 9% inferior respecto a la cepa silvestre.

Si tenemos en cuenta que *Thpg1* se encuentra como copia única en el genoma de *T. harzianum* y que la actividad endoPG del transformantes ePG5 se reduce hasta un 90% respecto a la de la cepa silvestre T34, parece que es menor la capacidad del transformante para utilizar pectina saprofiticamente. Aunque, si consideramos que en el genoma de este hongo existen otras pectinasas que pueden metabolizar la pectina y que se ha silenciado un único gen, el crecimiento también podría no haberse visto afectado. En este sentido, la disrupción de un gen que codifica una endoPG en *C. carbonum*, provocó una disminución de la actividad entorno al 30% sin afectar el crecimiento en un medio con pectina, hecho que se podría explicar por la presencia de otras pectinasas, entre ellas una exoPG (Scoot-Craig y col., 1990). Sin embargo, un doble mutante de *C. carbonum* en los genes que codifican una endoPG y una exoPG, mostró una disminución drástica en la actividad poligalacturonasa y, a su vez, su crecimiento fue un 20% inferior al de la cepa silvestre (Scott-Craig y col., 1998). También, disruptantes en un gen que codifica una endoPG en *A. citri*, mostraron una reducción de la actividad endoPG de un 83% y tras crecer el hongo durante 25 días en un medio líquido con

pectina, una reducción de 42% en el peso seco del micelio (Isshiki y col., 2001). Considerando todos los resultados en conjunto parece que el crecimiento en un medio selectivo disminuye cuando la actividad endopoligalacturonasa se ve seriamente reducida.

En el Capítulo 1 ya se indicó la importancia que podría tener la endoPG *Thpg1* de *T. harzianum* en su relación con la planta. A la vista de los resultados obtenidos en este capítulo se podría asignar a ThPG1 un papel fundamental en el proceso de maceración de material vegetal y, por tanto, en el crecimiento saprofitico del hongo. En este sentido, se han descrito endoPGs que no constituyen un factor de virulencia en el proceso de patogénesis (Gao y col., 1996; Di Pietro y col., 1998) y que su papel se limita a degradar material vegetal. Ya que la mayoría de las especies de *Trichoderma* y, particularmente, *T. harzianum*, no son hongos fitopatógenos sino agentes de control biológico, en este trabajo se analizó el papel que pudiera tener este gen en el diálogo con la planta. Son numerosos los estudios que relacionan las endoPGs con la capacidad para producir moléculas elicitoras de tipo OGAs, que desencadenan repuestas de defensa en plantas (Esquerré-Tugayé y col., 2000; Casasoli y col., 2008). Así, por un lado, se estudió el comportamiento de plantas de *A. thaliana* en interacción con un transformante de *T. harzianum* T34 silenciado en el gen *Thpg1* (Capítulo 3) y, por otro, se analizó la expresión de este gen en plantas de *A. thaliana* (Capítulo 4).

**Capítulo 3: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA
DE *Thpg1* MEDIANTE TECNOLOGÍA DE
MICROARRAYS DE *Arabidopsis***

RESULTADOS

Con objeto de profundizar en los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* descritos en el Capítulo 1 de resultados de esta Tesis Doctoral, se decidió abordar el análisis del transcriptoma de *A. thaliana* para determinar el papel que pudiera tener el gen *Thpg1* en su relación con la planta. Además este estudio también nos permitió obtener una visión global de la respuesta de *A. thaliana* en la interacción con *T. harzianum* T34. Para ello, se utilizaron *microarrays* comerciales de *A. thaliana*: *GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array* (Affymetrix). El proceso completo de tratamiento e hibridación de las muestras, así como el análisis estadístico de los resultados, se realizó en las Unidades de Genómica y Proteómica y de Bioinformática de la Universidad de Salamanca.

1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para obtener las muestras de ARN total de partida de *A. thaliana*, se utilizaron plantas de 25 días, crecidas en tierra-vermiculita (Figura 33).



Figura 33. Fotografía de plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 tomadas a los 25 días de crecimiento.

Para determinar el efecto que el silenciamiento del gen *Thpg1* en la cepa *T. harzianum* T34 pudiera tener en *A. thaliana*, se colonizaron las raíces de la planta con el transformante silenciado ePG5, por ser el que presentaba los menores niveles de actividad endopoligalacturonasa. De forma paralela, se realizó el mismo procedimiento con la cepa silvestre T34. En la Figura 34 se muestra el diseño experimental utilizado para el análisis del transcriptoma de *A. thaliana*, como se describe en el apartado 4.2.4

de Materiales y Métodos Se utilizaron tres réplicas biológicas por cada condición, y dos plantas por cada réplica. Los controles utilizados fueron *A. thaliana* (negativo) y *A. thaliana* colonizada con la cepa silvestre T34 (positivo).



Figura 34. Fotografía del diseño experimental con las interacciones planta-hongo realizado para el análisis llevado a cabo mediante *microarrays*.

Las plantas (parte aérea) utilizadas por cada réplica y condición, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, se liofilizaron y se mezclaron para realizar la extracción de ARN total, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 9.2.2 de Materiales y Métodos.

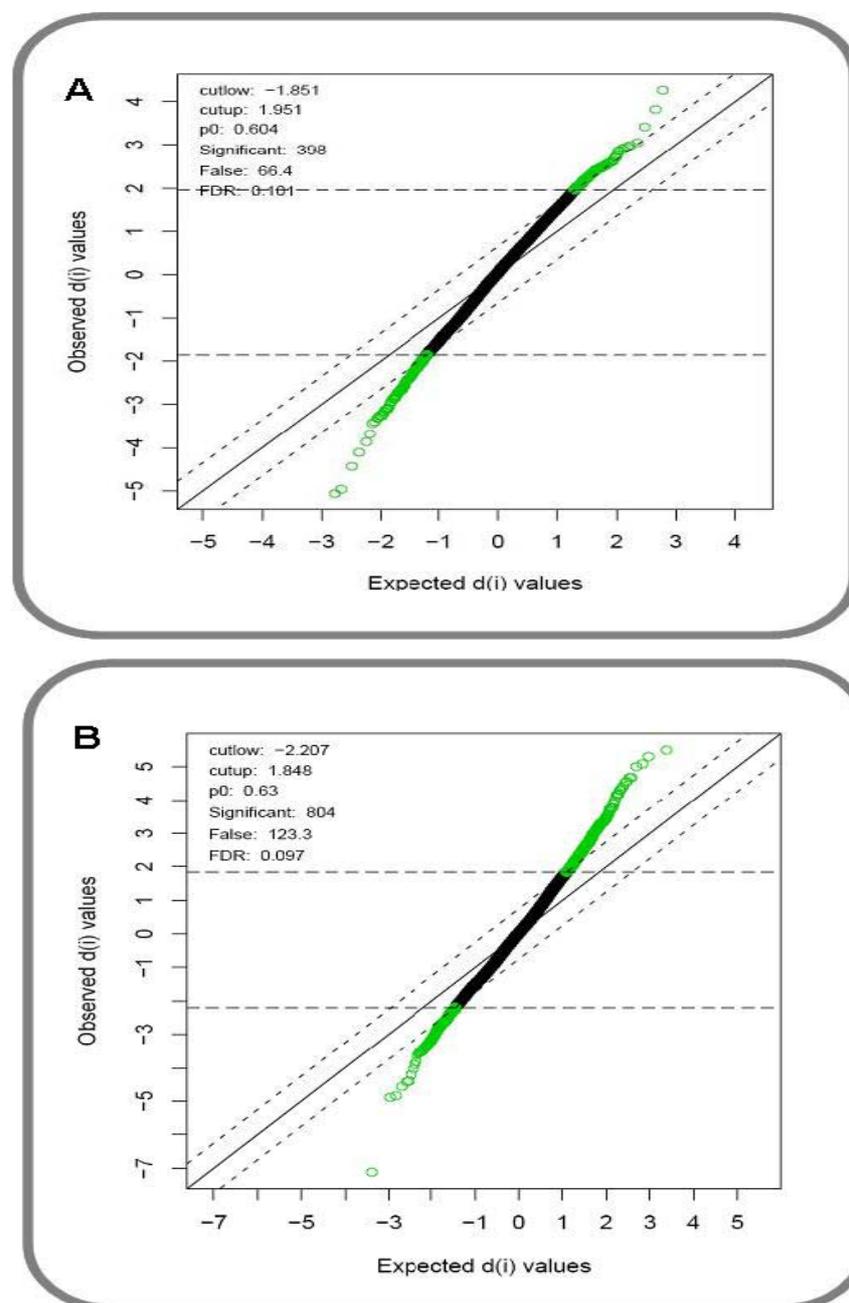
2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenido el ARN total de cada réplica, éste se envió a la Unidad de Génómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca donde se realizó el análisis del ARN, la obtención del ADNc, el marcaje de las sondas y su posterior hibridación con los *GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array* (Affymetrix), como se describe en los apartados 10.1.2, 10.3.4, 11.2.3 y 11.3.2.3 de Materiales y Métodos, respectivamente.

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El tratamiento estadístico de los datos se realizó en la forma descrita en el apartado 15.8.1 de Materiales y Métodos.

El estudio estadístico se llevó a cabo sobre tres situaciones: (i) control vs *T. harzianum* T34 (Figura 35.A); (ii) control vs transformante silenciado (Figura 35.B), y (iii) *T. harzianum* T34 vs transformante silenciado (Figura 35.C).



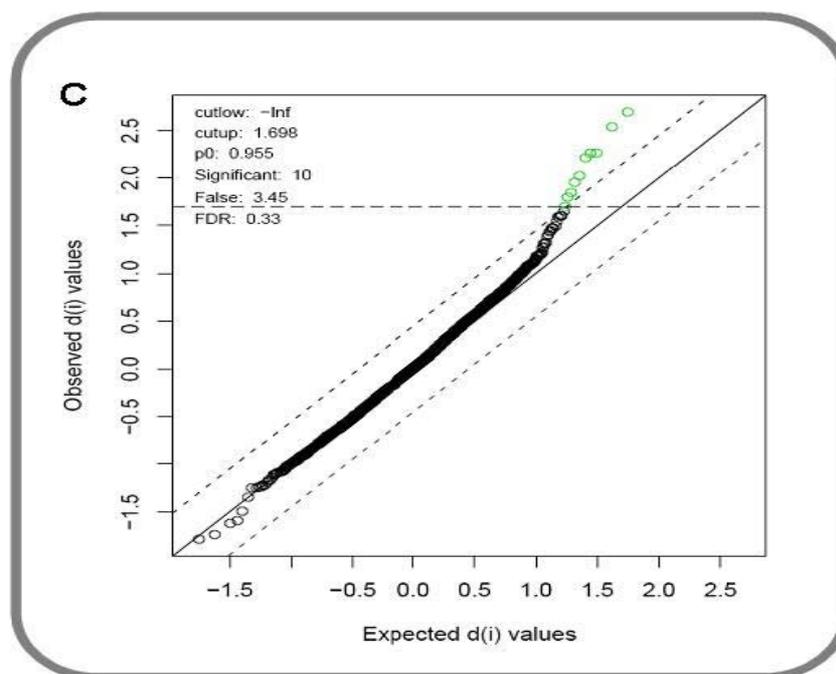


Figura 35. Representaciones del algoritmo SAM formando una diagonal de observados frente a esperados, con indicación de los que no varían (en negro) y de los que sí varían (separados de la diagonal en verde). Por encima de la diagonal aparecen los genes sobreexpresados y por debajo los genes reprimidos. **(A)** control (C) vs *T. harzianum* T34 (T34). **(B)** control (C) vs transformante silenciado (ePG5). **(C)** *T. harzianum* T34 (T34) vs transformante silenciado (ePG5).

En la Figura 35 se representan los gráficos que evalúan las permutaciones del algoritmo SAM de las tres situaciones a comparar. En la diagonal se sitúan los genes observados frente a los esperados, distinguiendo los genes que no varían (en negro), los genes que sí varían entre los dos estados contrastados (en verde), por arriba los sobreexpresados y por debajo los reprimidos. Tanto en la situación (i) como en (ii), se trabajó con un máximo del 10% de falsos positivos, apareciendo 398 y 804 genes diferenciales, respectivamente. En la situación (iii) sólo se detectaron 10 genes diferenciales (únicamente sobreexpresados) pero aceptando un FDR de 0.33, lo que significa asumir más del 30% de falsos positivos. Para mantener un máximo del 10% de falsos positivos (un FDR no superior a 0.11), sólo se pueden aceptar los 5 primeros genes diferenciales.

Los resultados se expresaron en función de su *R.fold* que representa el número de veces que se detecta más o menos expresión del gen correspondiente en presencia del transformante silenciado ePG5 o la cepa silvestre T34 dependiendo de la situación analizada.

Para el análisis de la función del gen *Thpg1* en su relación con la planta, la condición que más nos interesaba era la situación (iii), en la que se comparaba el transcriptoma de *A. thaliana* en presencia del transformante silenciado, ePG5. El listado de los 10 genes diferenciales se recoge en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis comparativo de los transcriptomas planta-T34 y planta-ePG5.

n°	Locus	<i>R.fold</i>	Gen
1	AT5G07550	11,92887791	<i>GRP19</i>
2	AT3G15400	6,655773599	<i>ATA20</i>
3	AT1G66850	8,399332109	NA
4	AT4G14130	3,746860025	<i>XTR7</i>
5	AT3G28500	2,876740474	NA
6	AT5G07560	2,386025521	<i>GRP20</i>
7	AT2G31980	4,089263646	NA
8	AT5G13930	1,779304888	c("AT5G13930.1", " <i>CHS</i> ")
9	AT4G03210	2,673671315	<i>XTH9</i>
10	AT1G75930	2,891639768	<i>EXL6</i>

R.fold, representa el número de veces que aumenta la expresión de un determinado gen de la planta en presencia de la cepa T34 frente a la cepa silenciada ePG5.

Los genes marcados en amarillo en la Tabla 11, se describen a continuación:

- *GRP19* y *GRP20*: proteínas ricas en glicina, de la familia de las oleosinas. Se encuentran en la mayoría de plantas y constituyen, junto con las proteínas ricas en prolina y las extensinas, un grupo de proteínas estructurales de la pared celular (Ringli y col., 2001).
- *ATA20*: proteína rica en glicina que se expresa diferencialmente en la antera (Rubinelli y col., 1998).
- NA: inhibidor de proteasas de la familia de las LTPs (*lipid transfer proteins*). Se han relacionado con respuesta de defensa a bacterias y hongos patógenos (Carvalho y Moreira, 2007).
- *XTR7* y *XTH9*: codifican para xiloglucosil transferasas que actúan sobre los polímeros de xiloglucano de la pared celular. Se ha determinado su expresión en sistemas de interacción planta-micorrizas (Maldonado-Mendoza y col., 2005).
- *CHS* (Chalcona sintasa): enzima que forma parte de la ruta de biosíntesis de flavonoides. Se ha relacionado con respuesta a patógenos (Shaw y col., 2006).

Aunque nuestro interés principal ha sido la determinación del papel del gen *Thpg1* en su relación con la planta, este estudio también nos permitió obtener una visión global de la respuesta de *A. thaliana* en una interacción con la cepa silvestre *T. harzianum* T34. Algunos de los genes que se expresaron diferencialmente en esta situación, se muestran en la Tabla 12. Los genes inducidos en *A. thaliana* por la presencia de *T. harzianum*, se muestran en rojo, mientras que los que aparecieron reprimidos, se muestran en verde.

Tabla 12. Análisis comparativo de los transcriptomas de planta y planta-T34.

n°	Locus	<i>R.fold</i>	Gen
1	AT4G09460	0,66897190	ATMYB6
2	AT3G16770	0,58412851	AT3G16770.1
3	AT4G34590	1,92767787	GBF6
4	AT1G33560	1,44719568	ADR1
5	AT1G08980	0,65650827	ATAMI1
6	AT3G03470	0,61416963	CYP89A9
7	AT4G35770	0,30387645	SEN1
8	AT1G15520	2,39539234	AT1G15520.1
9	AT5G17220	2,65619581	ATGSTF12
10	AT5G13000	1,29257096	ATGSL12

R.fold, representa el número de veces que la expresión del gen de la planta se encuentra inducida (en rojo) o reprimida (en verde) por la presencia de la cepa T34.

Los genes enumerados en la Tabla 12, se describen a continuación:

- ATMYB6: proteína de la familia de los factores de transcripción *myb*, que regulan genes implicados en el desarrollo y la respuesta de defensa en planta (Chen y col., 2006).
- AT3G16770.1: proteína de la familia de los factores de respuesta a etileno ERF/AP2, algunos de los cuales se activan en respuesta a diferentes estreses (Gutterson y Reuber, 2004).
- GBF6: proteína de la familia de los factores de transcripción bZIP, que se inducen por respuesta a diferentes estreses (Jakoby y col., 2002).
- ADR1: proteína con dominios NBS-LRR, ricos en leucinas, que participa en la respuesta a patógenos biotróficos mediada por SA (Grant y col., 2003).
- ATAMI1: proteína de la familia de las amidasas, relacionadas con la biosíntesis de IAA (Pollmann y col., 2003).
- CYP89A9: proteína de la familia de los citocromos P₄₅₀, que juegan un importante papel en la biosíntesis de un gran número de compuestos lipofílicos como fitoalexinas o giberelinas (Narusaka y col., 2004).

- SEN1: proteína implicada en procesos de defensa y senescencia en planta (Schenk y col., 2005)
- AT1G15520.1: proteína de la familia de los transportadores ABC, que facilitan el paso de metabolitos secundarios a través de la membrana (Yazaki, 2006).
- GSTF: proteína relacionada con la síntesis de antocianinas (Kitamura y col., 2004).
- ATGSL12: proteína que participa en la síntesis de callosa (Ostergaard y col., 2002), cuyos depósitos se han relacionado con respuestas de defensa SAR.

Además de los genes que se enumeran en la Tabla 12, también se encontraron varios genes, tanto inducidos como reprimidos, relacionados con el metabolismo de la pared celular como arabinofuranosidasas, xiloxidasas o galactosidasas.

4. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE *Northern*

Con objeto de confirmar los resultados obtenidos en los *microarrays*, se realizó un análisis tipo *Northern* para algunos de los genes descritos en las Tabla 11 y 12 (Figuras 36 y 37). Para ello, se utilizaron 15 µg del ARN total obtenido para el análisis con *microarrays* en las tres situaciones descritas en el apartado 3. Como sonda se utilizó una zona de 1219, 911, 450 y 900 pb de las secuencias que codifican las proteínas ATA20, CHS, SEN1 y el transportador ABC, respectivamente. Estas sondas se obtuvieron marcando con digoxigenina el producto de PCR obtenido tras amplificar el ADN genómico de *A. thaliana* con los oligonucleótidos ATA-1 y ATA-2, para el gen *ATA20*; CHS-1 y CHS-2, para el gen que codifica la chalcona sintasa; SEN1-f y SEN1-r, para el gen *SEN1*; y ABC-f y ABC-r, para el gen que codifica el transportador ABC. Como control de carga se utilizó el ARNr 18S obtenido, mediante PCR, con ADN genómico de *T. harzianum* T34, usado como molde, y los oligonucleótidos 18S-u y 18S-r.

En las situaciones planta-T34 frente a planta-ePG5, no se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión respecto al gen que codifica la chalcona sintasa que presentaba un *R.fold* de 1,78. Por otro lado, el nivel de expresión del gen *ATA20* fue mayor en la situación planta-T34 (Figura 36). Estas diferencias se observaron después de realizar tres medidas independientes de la señal obtenida para este gen, utilizando el programa de cuantificación *Quantity One* (BioRad). Este último resultado estaría de acuerdo, a pesar de no coincidir en cantidades, con los datos obtenidos en el *microarray*, en el que se observa una expresión diferencial (*R.fold*) entre planta-T34 y planta-ePG5 de 6,65.

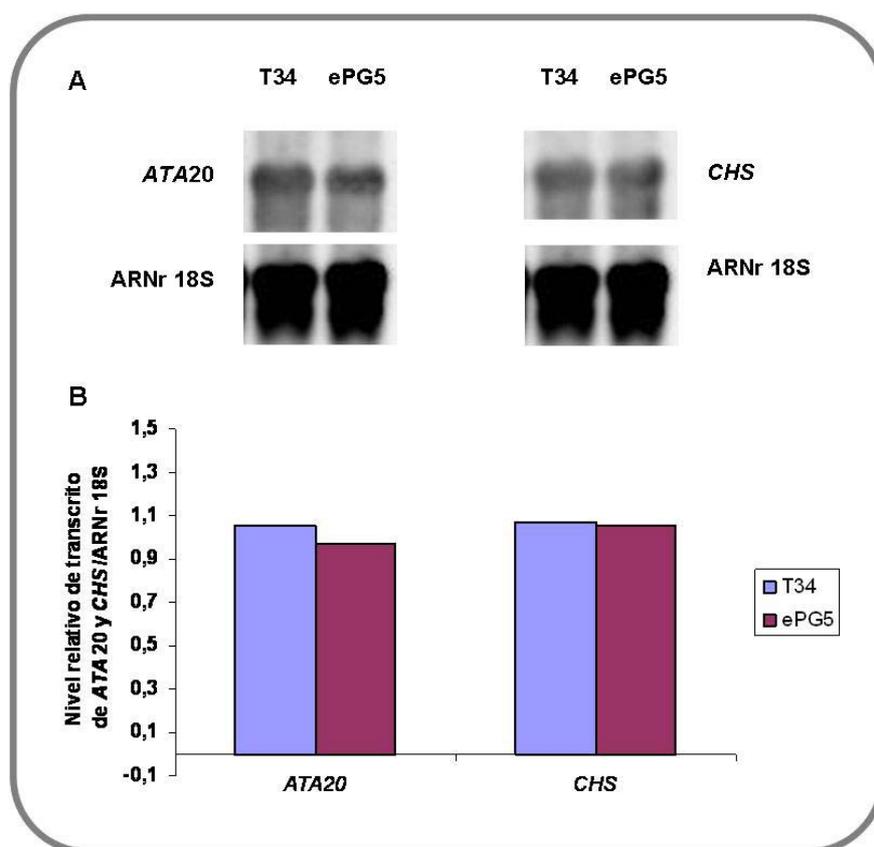


Figura 36. (A) Análisis tipo *Northern* de la expresión de *ATA20* y *CHS* de *A. thaliana*. El ensayo se realizó con 15 µg de ARN total extraído de material vegetal liofilizado. Las plantas se mantuvieron en medio MS durante 24 horas en las siguientes situaciones: (i) *A. thaliana* inoculada con germínulas de *T. harzianum* T34 (**T34**) y, (ii) *A. thaliana* inoculada con germínulas del transformante silenciado ePG5 (**ePG5**). Como control de carga se utilizó el ARNr 18S. **(B)** Niveles relativos de transcrito de *ATA20* y *CHS* frente al ARNr 18S.

Aunque en este trabajo de Tesis Doctoral no se incluyen todos los resultados obtenidos en las situaciones, control (C) vs *T. harzianum* T34 (**T34**) y control (C) vs transformante silenciado (**ePG5**), los resultados obtenidos en el *Northern* con los genes *SEN1* y *ABC* (Figura 37), confirman los resultados de los *microarrays* para estos dos genes. En relación con el gen *SEN1*, se observó que su expresión era mayor en presencia del hongo. Y con respecto al gen *ABC*, su expresión es ligeramente mayor en la planta sola. De manera similar a los resultados obtenidos con los genes *ATA20* y *CHS*, en este caso tampoco había una correlación entre las diferencias de expresión y los valores *R.fold* obtenidos en los *microarrays*.

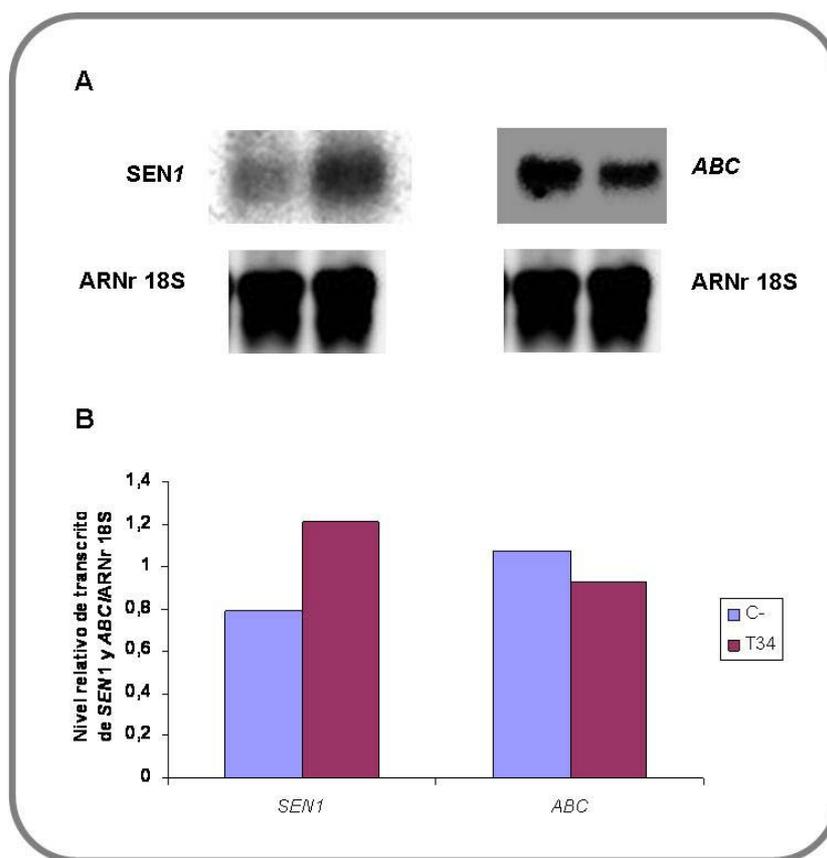


Figura 37. (A) Análisis tipo *Northern* de la expresión de *SEN1* y *ABC* de *A. thaliana*. El experimento se realizó con 15 μ g de ARN total extraído de material vegetal liofilizado. Las plantas se mantuvieron en medio MS durante 24 horas en las siguientes situaciones: (i) *A. thaliana* (C-) y, (ii) *A. thaliana* inoculada con germinulas de *T. harzianum* T34 (T34). Como control de carga se utilizó el ARNr 18S. **(B)** Niveles relativos de transcrito de *SEN1* y *ABC* frente al ARNr 18S.

DISCUSIÓN

En la actualidad hay un creciente interés por conocer cómo ciertos organismos, incluidos patógenos virulentos y avirulentos (Tuzun y Kuc, 1991), hongos micorrícicos (Borowicz, 1997) y rizobacterias (Benhamou y col., 1998), son capaces de desencadenar diferentes reacciones de defensa en las plantas. Esta respuesta se ha dividido en dos tipos: inmunidad localizada e inmunidad sistémica. La respuesta localizada consiste en el reconocimiento de diferentes moléculas producidas por los patógenos como son la flagelina, la quitina, etc., en el mismo lugar donde se produce la infección (Bittel y col., 2007). El reconocimiento de estas moléculas desencadena la activación de una respuesta hipersensible (HR) que, a su vez, puede llegar a provocar la muerte celular en la zona de infección.

Además, las plantas son capaces de activar otro tipo de respuestas dependiendo del microorganismo con el que interactúen (Pieterse y Van Loon, 1999). Así, existe la respuesta sistémica adquirida (SAR) que es desencadenada por organismos biotróficos que, a su vez, es dependiente de la producción de ácido salicílico (SA) y conlleva la síntesis de proteínas PR. Y, la respuesta sistémica inducida (ISR) que se produce por una colonización de las raíces de las plantas por rizobacterias y hongos micorrícicos (RISR), y que es dependiente de la producción de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). En este último caso, no se producen proteínas PR pero al igual que ocurre con la respuesta SAR es dependiente del regulador transcripcional NPR1.

En el caso de *T. harzianum*, el estudio de la respuesta de defensa que desencadena en la planta resulta, si cabe, un modelo más interesante, por ser una especie beneficiosa para la planta y que se utiliza como agente de control biológico. En este sentido, en los últimos años han aparecido varios trabajos que describen la respuesta elicitora de *Trichoderma* spp. en la planta (Harman y col., 2004; Shores y Harman, 2008).

Son varios los estudios que proponen una similitud entre la respuesta sistémica inducida por rizobacterias (RISR) y la respuesta desencadenada por *Trichoderma* (Alfano y col., 2007; Segarra y col., 2008). No obstante, también se han descrito respuestas de tipo SAR desencadenadas por *T. virens* (Howell, 2003) y *T. longibrachiatum* (Martínez y col., 2001). El hecho de que la línea que separa ambas respuestas no esté claramente delimitada y que, actualmente, se hable de un diálogo entre ambas rutas, nos indujo a estudiar la respuesta que desencadena la cepa de *T. harzianum* T34 en plantas de *A. thaliana* y, de este modo, tener una visión global de dicha interacción.

De esta manera, el análisis del transcriptoma de un organismo mediante el uso de *microarrays* permite conocer los cambios que se producen en el perfil de expresión de sus genes, de forma general y en un momento dado. Por este motivo, se utilizó el *chip* comercial *Affymetrix GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array*, que representa unos 24.000 genes del genoma de la planta modelo *A. thaliana*, para analizar los cambios provocados tanto por la cepa silvestre T34 como por una cepa silenciada en el gen *Thpg1*, en el transcriptoma de esta planta.

Un análisis de las diferencias entre los transcriptomas de *A. thaliana* y *A. thaliana* colonizada por la cepa silvestre T34 mostró que 398 genes sufrían cambios en el perfil de expresión debido a la presencia de la cepa T34 (algunos genes que aumentan o disminuyen su expresión en ambas situaciones se recogen en la Tabla 12).

De estos 398 genes expresados diferencialmente: el 56% se anotaron como desconocidos, el 27% estarían relacionados con el metabolismo, el 16% se relacionó con la regulación de la transcripción y en la transducción de señales, y un 12% estaría involucrado en la respuesta de la planta a diferentes estreses.

Entre los genes que se inducían en el transcriptoma de *A. thaliana* por la presencia de *T. harzianum* destacan varios factores de transcripción de las familias ERF (*ethylene response factor*), bZIP (*basic domain leucine zipper*), WRKY y MYB. Algunos de estos factores se han relacionados con el metabolismo de la pared celular, por ejemplo la familia de genes *myb* participa en la regulación genes que participan en su biosíntesis (Zhong y Ye, 2007). Además son numerosos los estudios que relacionan algunos de los genes de esta familia con respuesta de defensa en planta (Daniel y col., 1999; Lee y col., 2001; Gigolashvili y col., 2007; Van der Ent y col., 2008). En el análisis del transcriptoma de *A. thaliana* en presencia de *T. harzianum* encontramos que tres genes de la familia génica *myb* estaban inducidos por la presencia del hongo. En este sentido, se ha relacionado el factor de transcripción MYB72 con la inducción de ISR en *A. thaliana* mediada por *T. asperellum* T34 (Segarra y col., 2008). No obstante, son numerosos los genes *myb* a los que todavía no se les ha asignado una función. Otros factores de transcripción que se activaron en la planta tras la colonización de *T. harzianum* son algunos relacionados con la respuesta a etileno (ERF), concretamente, un factor de la familia AP2. Así, se ha descrito como el ERF1, un factor de esta familia, participa en la activación de genes de respuesta a patógenos (Lorenzo y col., 2003).

Otros genes que se encuentran inducidos por la presencia de *Trichoderma* son aquellos que codifican los citocromos 89A9, 71B34 y 71B23. Éstos pertenecen a la superfamilia de citocromos P₄₅₀ que están implicados en respuestas a estreses bióticos y abióticos (Narusaka y col., 2004). Se ha descrito cómo en plantas de pimiento un citocromo de la familia CYP89A se expresa en respuesta a la interacción con una cepa avirulenta de *Xanthomonas axonopodis* (Kim y col., 2006).

Entre el grupo de genes relacionados con la biosíntesis del IAA, una hormona de la familia de las auxinas, destaca la inducción del gen *ATAMI1* que participa en su síntesis (Pollmann y col., 2003). Está descrito como las auxinas de la planta son inhibidas por SA para contrarrestar el ataque del patógeno (Wang y col., 2007). Además, se ha descrito que *Trichoderma* es capaz de regular los niveles de auxinas en la rizosfera (Björkman, 2004).

También se encuentra inducido por la cepa T34 un gen que codifica una proteína implicada en defensa y senescencia en planta (*SEN1*). Este gen está regulado tanto por SA como por JA (Schenk y col., 2005).

Entre los genes que se encuentran reprimidos en el transcriptoma de *A. thaliana* por la presencia de *T. harzianum* T34 están el factor de transcripción *GBF6/ATB2/bZIP11*, cuya expresión se reprime por la presencia de sacarosa (Hanson y col., 2008). Este hecho nos lleva a pensar que los niveles de sacarosa en *A. thaliana* estarían aumentados por la presencia de *Trichoderma*, sin embargo, uno de los genes cuya expresión se reprime cuando los niveles de este azúcar son altos es la asparragina sintetasa (*ASN1*) (Bläsing y col., 2005) y, en esta interacción, la expresión de *ASN1* aumentaba, por lo que T34 no estaría incrementando los niveles de sacarosa. Por tanto, respecto a la expresión del gen *GBF6*, cabe pensar que haya otros factores que repriman su expresión, ya que este gen regula en la planta procesos de desarrollo, de defensa o de respuesta a diferentes estreses (luz o temperatura) (Jakoby y col., 2002).

Otro gen cuya expresión está reprimida por la presencia de *Trichoderma* es *ADR1*, que está relacionado con proteínas ricas en leucinas, del tipo NBS-LRR, y que es inducido por SA en respuesta a patógenos biotróficos pero no por JA (Grant y col., 2003). También se observó la represión de otros genes inducidos por SA como el *ATGSTF12*, que codifica una glutatión transferasa (Gruhler y col., 2005), y el *ATGSL12*, que codifica una callosa sintasa y que están relacionadas con las defensas de planta (Kohler y col., 2002).

Un gen que codifica un transportador ABC también se encuentra reprimido por la presencia de *T. harzianum* T34. Este tipo de genes está regulado tanto por SA como por JA (Stukkens y col., 2005). No obstante, un análisis de la expresión de un transportador ABC de *Nicotiana plumbaginifolia* (*NpPDR1*) en interacción con varias cepas de *Pseudomonas* spp. que no causan una respuesta hipersensible en esta planta, inducían la expresión de este transportador, y por el contrario, una cepa de *Pseudomonas syringae* que causa respuesta hipersensible en *N. plumbaginifolia* apenas inducía la expresión de este gen (Stukkens y col., 2005). En este sentido, *T. harzianum* T34 no parece mediar respuestas hipersensibles de tipo SAR, por lo que resulta extraño una represión para este transportador, ya que estaría más relacionado con la ruta del JA (Stukkens y col., 2005). No obstante, el estudio de un gen homólogo a *NpPDR1* en *A. thaliana* (*AtPDR12*) reveló que su expresión era mayor en respuesta a SA (Campbell y

col., 2003). Otra función descrita para los transportadores ABC es su implicación en procesos de destoxificación de plomo (Lee y col., 2005).

A la vista de los resultados obtenidos en los *microarrays* de *A. thaliana* podría decirse que *T. harzianum* T34 activa la expresión en la planta de numerosos genes relacionados con procesos de crecimiento y desarrollo, así como genes regulados por JA y ET, lo que indicaría una implicación de *T. harzianum* en respuestas de tipo ISR. Por el contrario, los genes que son activados por SA parecen no parecer estar activados y, algunos incluso se encontrarían reprimidos. No obstante, hay que tener en cuenta que son numerosos los genes que forman parte de estas familias cuya función no está descrita y que actuarían como inductores o represores en las distintas rutas de señalización. Además, la expresión de alguno de los 398 genes diferenciales parece mucho más relacionada con SAR más que con una respuesta ISR. Por tanto, pese a que la respuesta que desencadena *T. harzianum* T34 en la planta parece estar únicamente mediada por JA/ET y a que no se detectaron cambios en la expresión de genes marcadores, como *pr1*, implicado en la respuesta SAR, no podría descartarse que, al menos la cepa T34 pudiera estar también implicada en la defensa mediada por SA.

Respecto al análisis de la función del gen *Thpg1*, tras comparar los transcriptomas de las interacciones *A. thaliana*-T34 (cepa silvestre) y *A. thaliana*-ePG5 (cepa silenciada en *Thpg1*), se obtenía una lista de 10 genes que se inducían en la planta solamente en presencia de la cepa silvestre T34. Este número de genes se debería tomar con cierta precaución ya que se trabajó con un valor FDR de 0,33 lo que significaba una probabilidad de falsos positivos del 33%.

Algunos de esos genes como *GRP19*, *GRP20*, *ATA20*, *XTR7* y *XTH9* codifican proteínas que se han relacionado con la pared celular vegetal, tanto a nivel estructural como de metabolismo, incluso, a algunos se les ha asignado una segunda función relacionada con defensa. Así los genes *GRP19* y *GRP20*, que pertenecen a un grupo que codifica proteínas estructurales de la pared celular, constituyen un sistema de reparación de la planta (Mousavi y Hotta, 2005). Si se tiene en cuenta que estos 5 genes se expresan menos en presencia del transformante que lleva el gen *Thpg1* silenciado, podríamos relacionar la acción enzimática de la endoPG con una hidrólisis de la pared de la planta y como consecuencia, en presencia de la cepa silvestre T34, se induciría la expresión de estos genes en *A. thaliana*. En este sentido, la aplicación de una preparación de glucanos del patógeno *Phytophthora megasperma* a plantas de tabaco provocaba la expresión máxima de un gen de la familia de las GRPs a las 4 horas de la inoculación (Brady y col., 1993). Por otro lado, los genes *XTR7* y *XTH9*, codifican proteínas que degradan el xiloglucano, el principal constituyente de la hemicelulosa de la pared celular de las plantas. En estudios realizados en la simbiosis de la micorriza *Glomus versiforme* con la planta *Medicago truncatula*, se ha propuesto que es necesaria una expresión, en la planta, de genes de la familia de las XTH para favorecer la colonización de las raíces por parte de la micorriza (Maldonado-Mendoza y col., 2005).

Estos resultados estarían de acuerdo con el hecho de que el primer desencadenante de la respuesta de defensa en la planta es la degradación de la pared celular, a través de la producción de OGAs (Esquerré-Tugayé y col., 2000). En este sentido, se conoce muy bien la capacidad elicitora de las endoPGs en la planta (Ridley y col., 2003).

También se ha comprobado la capacidad de los OGAs para inducir la expresión de genes como el que codifica la chalcona sintasa, que se expresa diferencialmente en presencia de la cepa silvestre T34 y se ha relacionado con respuestas de defensa (Shaw y col., 2006). Junto a estos genes, también se expresó diferencialmente en ambas interacciones, un gen relacionado con la familia de las LTPs, proteínas que también están implicadas en respuestas de defensa en planta (Carvalho y Moreira, 2007).

En relación con las proteínas que degradan el xiloglucano, un estudio reciente basado en un análisis 2D DIGE demuestra como los OGAs inducen la expresión de proteínas del apoplasto en *A. thaliana* (Casasoli y col., 2008). Sin embargo, este estudio también muestra la disminución de los niveles de una α -xilosidasa, dato que no estaría de acuerdo con los resultados obtenidos para *Thpg1* mediante *microarrays*. Aunque estos autores también proponen que sólo algunos de estos genes estarían reprimidos por la necesidad de la planta de ralentizar la degradación de los polímeros de la pared celular durante la infección.

En cuanto a los genes de la planta expresados diferencialmente en presencia de *T. harzianum* T34 que habríamos esperado encontrar, y no fue así, están aquellos que codifican PGIPs; no obstante como se recoge en la discusión del Capítulo 4 de esta memoria, *A. thaliana* parece no tener PGIPs que inhiban la proteína ThPG1.

A pesar de que los resultados obtenidos en los *microarrays* para los genes *ATA20*, *CHS*, *SEN1* y *ABC* se confirmaron por *Northern*, los resultados no mostraron una clara correlación a nivel cuantitativo entre las diferencias de expresión y los valores *R.fold*.

Por tanto, el gen *Thpg1* además de ser un factor fundamental en el proceso de degradación de material vegetal durante la etapa saprofítica de *T. harzianum*, como se indica en los Capítulos 1 y 2 de esta Tesis Doctoral, también tendría un papel relevante, a través de la producción de OGAs, en la inducción de respuestas de defensa en la planta. No obstante, todavía falta dilucidar, sin temor a equivocarnos, que además de la respuesta ISR de la planta, *T. harzianum* también sea capaz de activar, de forma secuencial o simultánea, las respuestas de tipo SAR.

**Capítulo 4: SOBREENPRESIÓN DEL GEN *Thpg1* EN
PLANTAS DE *A. thaliana***

RESULTADOS

1. OBTENCIÓN DE PLANTAS DE *A. thaliana* QUE EXPRESAN EL GEN *Thpg1*

1.1 Construcción del vector de expresión pBI121-*Thpg1*

El siguiente objetivo de este trabajo fue la obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresaran el gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34. Para ello, se construyó el plásmido pBI121-*Thpg1*, que deriva del plásmido pBI121 (Chen, 2003) y que contiene el promotor constitutivo 35S CaMV, el gen completo *Thpg1*, el terminador NOS de *A. tumefaciens* y el gen *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) que confiere resistencia a la kanamicina. Este *cassette* de expresión se encuentra situado entre los bordes derecho e izquierdo (RB y LB) del plásmido, formando el T-DNA que se integrará en el genoma de la planta. El proceso de construcción de este plásmido está recogido en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos.

1.2. Transformación de *A. tumefaciens* con pBI121-*Thpg1*

Puesto que la transformación de las plantas de *A. thaliana* se realiza mediante la infección con *A. tumefaciens*, el primer paso fue la introducción del plásmido pBI121-*Thpg1* en esta bacteria.

Se eligió la cepa de *A. tumefaciens* C58C1 que contiene el plásmido binario desarmado pGV2260 (Deblaere y col., 1985). Este plásmido contiene los genes *vir*, necesarios para la integración del T-DNA en el genoma de la planta, y confiere resistencia a la rifampicina. La transformación se realizó mediante electroporación (proceso descrito en el apartado 7.1.2 de Materiales y Métodos) según el método de Dower y col. (1988). Se utilizaron 0,5 µg de ADN plasmídico y 30 µL de células competentes de *A. tumefaciens*. La selección de colonias se realizó en placas de agar LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL).

Para confirmar que las colonias resistentes a kanamicina llevaban el vector de expresión pBI121-*Thpg1*, se realizó una extracción de ADN plasmídico y, mediante una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos pBI-sen y endop-2, se amplificó un fragmento de 1482 pb correspondientes a parte del promotor 35S CaMV y el gen *Thpg1*. La PCR resultó positiva para las 6 colonias analizadas (Figura 38).

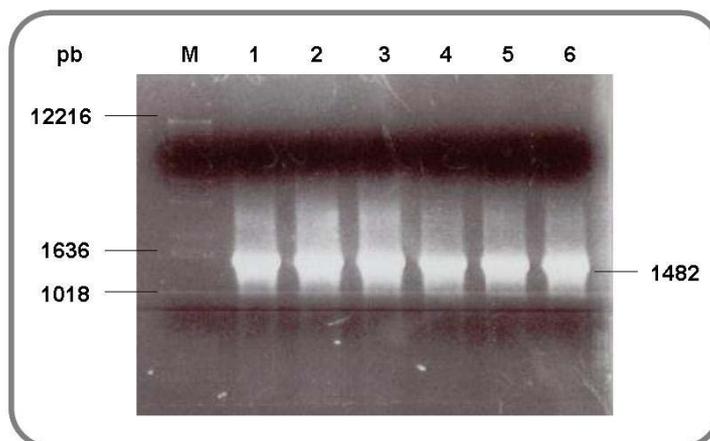


Figura 38. Productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones de ADN plasmídico de seis colonias de *A. tumefaciens* transformadas con el vector pBI121-*Thpg1*. M: marcador X (Roche).

1.3. Infección de plantas de *A. thaliana* con las cepas transformadas de *Agrobacterium*

Para la transformación se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0. En primer lugar se sembraron las semillas, previamente esterilizadas, en macetas con tierra y vermiculita en una proporción de 3:1. Se incubaron a 22°C con un fotoperiodo de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz, y una humedad del 70%. Una vez formadas las inflorescencias primarias, éstas se cortaron para promover el desarrollo de inflorescencias secundarias. Cuando las plantas tenían numerosas inflorescencias y los primordios florales aún permanecían cerrados, se procedió a infectarlas con las cepas de *A. tumefaciens* que llevaban el plásmido pBI121-*Thpg1*.

El proceso de infección se realizó por el método de Clough y Bent (1998), tal y como se describe en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. Brevemente, se preparó un cultivo saturado de *A. tumefaciens* que se resuspendió en una solución de infiltración. Las inflorescencias de las plantas de *A. thaliana* se sumergieron en esta solución durante dos minutos y se cubrieron con plásticos para mantener una atmósfera húmeda. A los tres días, se retiraron los plásticos y las plantas se incubaron en las condiciones antes descritas, hasta que produjeron semillas. Las semillas correspondientes a la primera generación (T1) se sembraron en placas de agar MS, suplementado con kanamicina (50 µg/mL), y se añadió cefotaxima (250 µg/mL) para evitar contaminaciones por *Agrobacterium*. Finalmente, se obtuvieron seis líneas resistentes a kanamicina, correspondientes a la tercera generación: T2b1, T2c1, T2d2, T2e1, T2g3 y T2k5. En la Figura 39 se muestran cuatro de las seis líneas transgénicas crecidas en un medio MS suplementado con kanamicina.

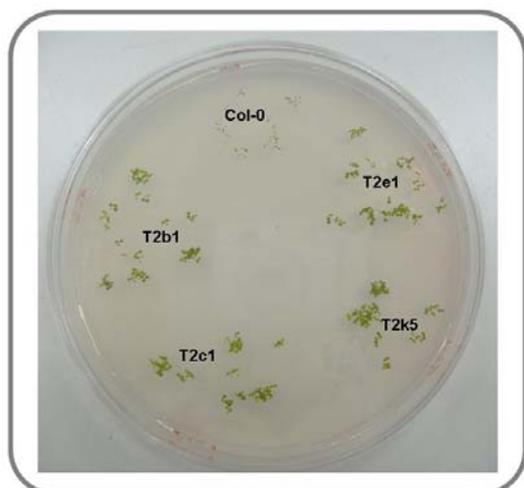


Figura 39. Crecimiento de la línea silvestre Col-0 de *A. thaliana* y cuatro líneas transformadas con el plásmido pJL43b1-*Thpg1* que mostraban resistencia a kanamicina (T2b1, T2c1, T2e1 y T2k5).

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS TRANSFORMADAS CON pJL43b1-*Thpg1*

2.1. Comprobación y selección de los transformantes

Para confirmar que el gen *Thpg1* se había integrado en el genoma de las plantas, se extrajo el ADN genómico de las seis líneas transgénicas y de la línea silvestre (Col-0), y se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos pBI-sen y endop-2. En las seis líneas transgénicas se obtuvo el fragmento de PCR de 1482 pb esperado (Figura 40).

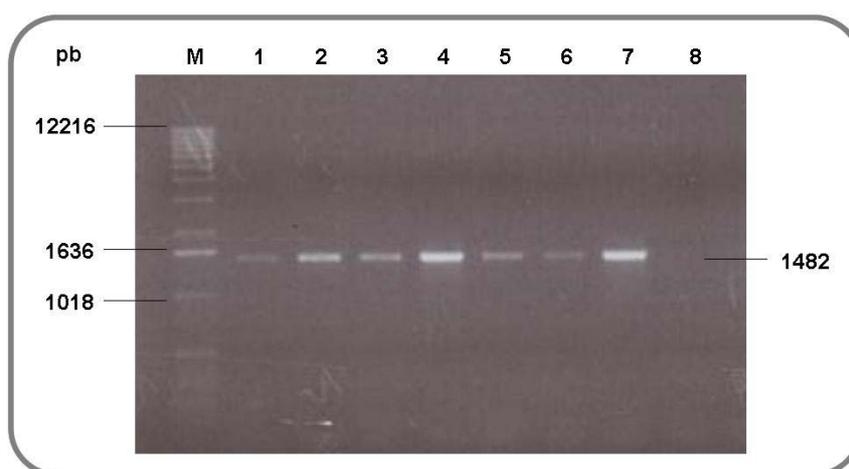


Figura 40. Productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones de ADN genómico de plantas de *A. thaliana* T2d2 (1), T2c1 (2), T2b1 (3), T2k5 (4), T2g3 (5), T2e1 (6), L2 (7) y Col-0 (8), utilizando los oligonucleótidos pBI-sen y endop-2. M: marcador X (Roche).

2.2. Confirmación de los transformantes: análisis tipo *Southern*

Para conocer el número de copias del gen *Thpg1* en el genoma de *A. thaliana* se realizó un análisis tipo *Southern* de las líneas transformadas y de Col-0. Se digirieron 10 µg de ADN genómico de cada línea con *EcoRI* que corta una vez en el plásmido pBI121-*Thpg1* y que no tiene sitio de corte en la secuencia de *Thpg1*. Como sonda se utilizó el gen *Thpg1* marcado con ^{32}P . Se confirmó que al menos cinco de las líneas eran transformantes y que cada una de ellas llevaba al menos una copia del gen *Thpg1* (Figura 41).

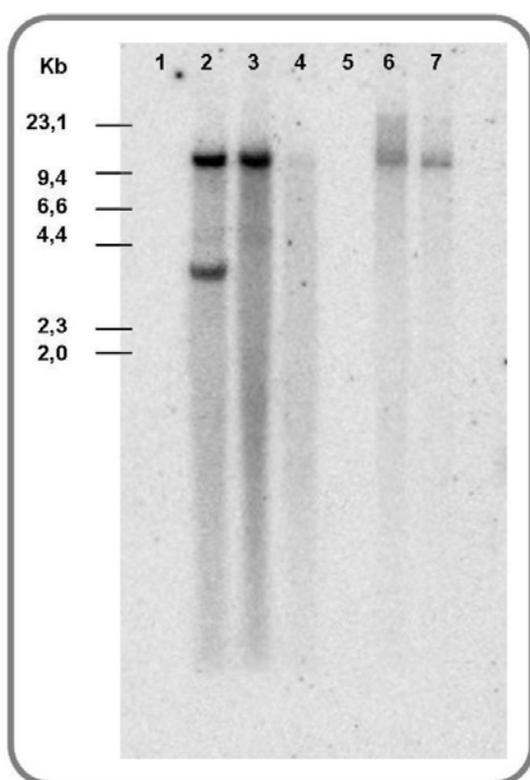


Figura 41. Análisis tipo *Southern* del gen *Thpg1* en la línea silvestre Col-0 (1) y en las líneas transgénicas T2c1 (2), T2b1 (3), T2d2 (4), T2g3 (5), T2e1 (6) y T2k5 (7). El ADN genómico fue digerido con *EcoRI*, la hibridación se realizó en condiciones restrictivas y como sonda se utilizó la secuencia completa del gen *Thpg1*. Marcador λ *HindIII* (Roche).

Se decidió seguir trabajando con las líneas T2b1 y T2c1 por presentar una y dos copias del gen *Thpg1*, respectivamente.

2.3. Análisis de la expresión de *Thpg1* en los transformantes seleccionados

Para conocer si el gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34 se expresaba en las plantas transformadas, se realizó un análisis tipo *Northern*. Se utilizaron 15 µg de ARN total extraído de plántulas de 10 días de crecimiento, germinadas en medio MS. Como sonda se utilizó el gen *Thpg1* y como control de carga el ARNr 18S (Figura 42).

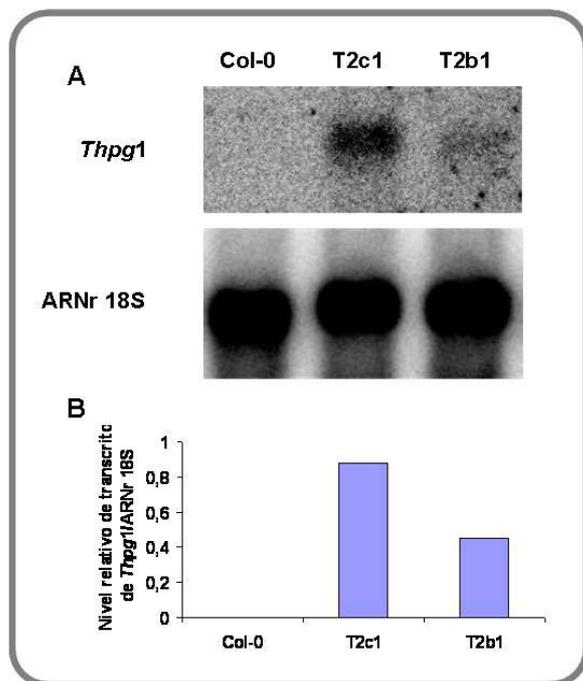


Figura 42. (A) Análisis tipo *Northern* de la expresión del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34 en plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y las líneas transgénicas T2b1 y T2c1. El ensayo se realizó con 15 μ g de ARN total extraído de tejido liofilizado de plántulas crecidas durante 10 días en medio MS. (B) Niveles relativos de transcrito de *Thpg1* frente al ARNr 18S.

Se observó expresión del gen *Thpg1* en las dos líneas analizadas. El mayor nivel de transcrito se observó en la línea T2c1.

2.4. Análisis de la actividad endopoligalacturonasa en los transformantes seleccionados

Para comprobar si la proteína codificada por el gen *Thpg1* era funcional en *A. thaliana* se realizó un ensayo de actividad utilizando la parte aérea de plántulas de 10 días crecidas en medio MS. Una vez liofilizado el material se realizó una extracción de proteínas intracelulares tal y como se indica en el apartado 12.2 de Materiales y Métodos.

Se detectó actividad en las tres líneas, siendo 3,5 veces mayor en la línea transgénica T2c1 que en Col-0. La diferencia entre los valores de actividad medios en T2c1 y Col-0 fue estadísticamente significativa (*) tras analizar los datos mediante el test de Fisher (Figura 43).

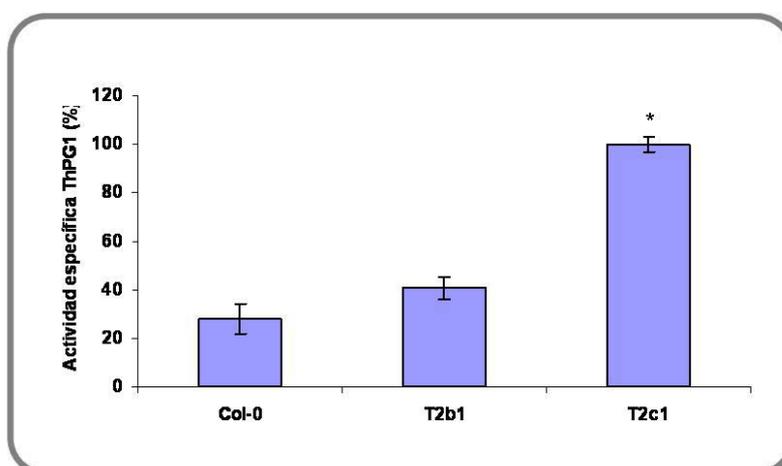


Figura 43. Actividad endopoligalacturonasa específica (U/mg proteína total) analizada en plantas de *A. thaliana*: línea silvestre (Col-0) y dos líneas transgénicas (T2b1 y T2c1). Cada valor es la media de tres medidas \pm la desviación estandar. El asterisco (*) representa diferencias de actividad estadísticamente significativas.

2.5. Ensayos de resistencia a estreses abióticos

Para comprobar si la expresión heteróloga del gen *Thpg1* en *A. thaliana* afectaba a su resistencia a algún tipo de estrés abiótico, se analizó la germinación de las semillas en condiciones que simulaban un estrés osmótico (manitol) y uno salino (NaCl) (apartado 13.2 de Materiales y Métodos). Para ello se sembraron semillas de las líneas transgénicas y de Col-0 en medio MS, suplementado con manitol 100 mM o NaCl 50 o 100 mM. Las placas se incubaron a 22°C durante 10 días y se realizó un recuento del número de semillas germinadas. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Porcentajes de germinación de las semillas de Col-0 y de las dos líneas transgénicas que expresan el gen *Thpg1*, tras una incubación a 22°C durante 10 días en medio MS suplementado con manitol (estrés osmótico) o NaCl (estrés salino). Cada valor es la media de tres experimentos independientes \pm su desviación estándar. Los valores marcados con un asterisco mostraron diferencias significativas respecto a la línea silvestre ($P < 0,05$) en un análisis estadístico tipo ANOVA.

% Germinación	MS	Manitol 100 mM	NaCl 50 mM	NaCl 100 mM
Col-0	96,6 \pm 0,6	83,3 \pm 1,5	85,0 \pm 1,7	30,0 \pm 1,0
T2b1	90,0 \pm 1,0	86,6 \pm 1,7	94,2 \pm 2,3*	65,0 \pm 1,7*
T2c1	90,0 \pm 1,0	90,0 \pm 1,5*	95,0 \pm 0,6*	81,6 \pm 1,1*

En ausencia de un estrés abiótico (medio MS), el porcentaje de germinación de semillas en las dos líneas transgénicas fue un 6,6% menor que el observado en la línea Col-0. Sin embargo, ambas líneas transgénicas mostraron mayores porcentajes de germinación que Col-0 bajo un estrés osmótico o uno salino. Las mayores diferencias se observaron tras el crecimiento en un medio con alta concentración de NaCl (100 mM) y, a su vez, las mayores diferencias se observaron entre Col-0 y la línea T2c1 que poseía dos inserciones del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34. Las diferencias de germinación entre Col-0 y ambas líneas transgénicas fueron estadísticamente significativas, bajo todas las condiciones de estrés analizadas, excepto para la línea T2b1 en manitol 100 mM, tras analizar los datos mediante el test de Fisher.

2.6. Análisis morfológico (fenotípico)

Para determinar si la expresión heteróloga del gen *Thpg1* en *A. thaliana* afectaba a su desarrollo, se cultivaron plantas de la línea silvestre y las dos líneas transgénicas en tierra-vermiculita a 21-24°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y una humedad del 70%, durante 40 días. Se pudo observar que el fenotipo de las líneas transgénicas era diferente al de la línea silvestre. El tamaño de la roseta era dos veces mayor en la línea silvestre que en las líneas transgénicas y la inflorescencia primaria emergió antes en estas últimas, presentando un porte más fino y alargado que en la línea silvestre. Por otro lado, no se pudo observar diferencias entre las dos líneas transgénicas, a simple vista (Figura 44).



Figura 44. Imágenes de la línea silvestre de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y las dos líneas transgénicas, T2b1 y T2c1, después de 40 días de crecimiento.

Para comprobar si este crecimiento diferencial de la parte aérea, que presentaban las líneas transgénicas, afectaba también a su parte radical, se sembraron semillas de la línea silvestre y de los dos transformantes, en placas MS dispuestas de manera vertical en condiciones similares a las descritas anteriormente. El ensayo se realizó con 5 semillas por placa hasta un total de 10 placas por cada línea.

Se observó que en las líneas transgénicas la longitud de la raíz era menor que en la línea silvestre (Figura 45), y que estas diferencias eran estadísticamente significativas después de analizar los datos mediante el test de Fisher. Por otra parte, la longitud de la raíz entre la línea transgénica T2b1 era mayor que la de la línea T2c1.



Figura 45. Ensayo de crecimiento radical de la línea silvestre Col-0 y de las dos líneas transgénicas, T2b1 y T2c1, que expresan el gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34. Las semillas se sembraron en medio MS y las placas se incubaron, en oscuridad y en posición vertical, a 22°C durante 10 días.

2.7. Análisis de hormonas en las líneas seleccionadas

A la vista de los resultados fenotípicos obtenidos, se realizó un análisis de hormonas [ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA)] en la línea silvestre y las dos líneas transgénicas. Para ello, se sembraron semillas y se crecieron en tierra-vermiculita durante 40 días, en las mismas condiciones descritas para el estudio fenotípico. Se recogió la parte aérea de las plantas y se congeló en N₂ líquido para, posteriormente, liofilizar el material. Los datos hormonales se obtuvieron tal y como se describe en el apartado 14 de Materiales y Métodos. Las medidas de las hormonas se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Aurelio Gómez Cadenas del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universidad Jaume I, Castellón.

Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 46, donde se representa los ng de ABA, JA o SA obtenidos para las dos líneas transgénicas, T2b1 y T2c1, y la línea silvestre Col-0. En las dos líneas transformadas se obtuvieron mayores niveles de ABA y JA que en la línea silvestre. No obstante, sólo se obtuvieron diferencias significativas para la línea T2c1. Por otro lado, los niveles de SA fueron menores en las dos líneas transgénicas, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para ambas líneas.

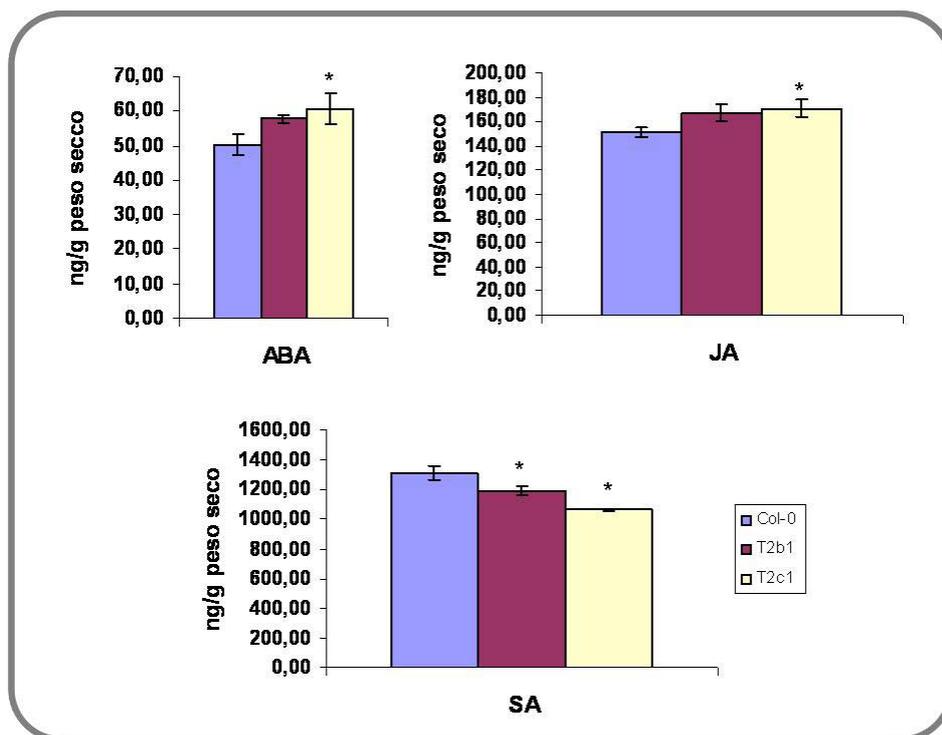


Figura 46. Medida de hormonas (ABA, JA y SA) en *A. thaliana* ecotipo Col-0 y los transformantes T2b1 y T2c1, después de 40 días de crecimiento. El resultado es la media, con su desviación estándar, de los valores obtenidos en tres experimentos independientes. El asterico (*) representa diferencias en la cantidad de hormona estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

Algunos genes de *Trichoderma*, sobre todo aquellos que codifican hidrolasas, se han utilizado como herramientas moleculares para aumentar la resistencia a enfermedades fúngicas en plantas como tabaco y patata (Lorito y col., 1998), brécol (Mora y Earle, 2001) o algodón (Chandranth y col., 2003). En este sentido, apenas existen referencias sobre transformación de plantas con genes que codifiquen endoPGs de hongos (Boudart y col., 2003; Capodicasa y col., 2004). Por contra, hay varios trabajos sobre plantas transformadas con endoPGs de origen vegetal (Osteryoung y col., 1990; Atkinson y col., 1990; Sander y col., 2001). En este trabajo se introdujo el gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34 en la planta modelo *A. thaliana* con el objetivo de analizar el efecto que tiene la expresión de un gen que codifica una endoPG de *Trichoderma* en una planta y, más en particular, el comportamiento de estos transformantes frente a diferentes tipos de estrés.

Aunque hubiera sido más útil introducir *Thpg1* en un cultivo con importancia agronómica y la extrapolación de resultados entre distintas especies debe tomarse con cautela, en este trabajo se eligió *A. thaliana* porque presenta una serie de características que la hacen idónea para este tipo de estudios. Esta planta posee un ciclo de vida corto, se puede cultivar sin grandes dificultades, es muy prolífica (capaz de producir hasta 10.000 semillas por planta), es autógama y posee un genoma haploide muy pequeño (\approx 157 Mb) repartido en 5 cromosomas que han sido secuenciados (Bennett y col., 2003). Además, los sistemas de transformación son sencillos, obteniéndose una alta eficacia de transformación (Clarke y col., 1992), y se dispone de numerosas colecciones de mutantes (Salinas y Sánchez-Serrano, 2006).

Se expresó *Thpg1* en *A. thaliana* bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV y la transformación se realizó mediante la infección de los primordios florales con *A. tumefaciens*. Las semillas se seleccionaron por su resistencia a kanamicina, obteniéndose varias líneas transgénicas correspondientes a la tercera generación, en la que el gen introducido se encuentra en homocigosis. La inserción del *cassette* de expresión se confirmó mediante PCR en las seis líneas analizadas y, posteriormente, se realizó un análisis tipo *Southern* para conocer el número de copias de *Thpg1* que se había introducido en los transformantes. Se confirmó que cuatro de las seis líneas llevaban una copia del gen *Thpg1* y que la línea T2c1 tenía dos copias. Resultó curioso que en las cuatro líneas, la banda que correspondía al *cassette* de transformación fuera de idéntico tamaño, si se tiene en cuenta que la integración del T-DNA en el genoma de la planta se produce al azar (Tzfira y col., 2004). Sin embargo, algunos estudios han mostrado la existencia de preferencia por algunas regiones intergénicas (Alonso, 2003).

Por otro lado, una de las dos inserciones que se observaron en la línea T2c1 era de un tamaño inferior a 4 kb, y el tamaño del T-DNA después del corte con la enzima *EcoRI* sería de aproximadamente 4,7 kb. El hecho de que el tamaño más pequeño que puede tener el inserto sea de este tamaño, nos hizo suponer que la copia de 4 kb estaría truncada.

El siguiente paso fue analizar la expresión de *Thpg1* en dos de las líneas transformantes, T2b1, que presentaba una única inserción, y T2c1, que presentaba dos inserciones, además de incluir como control la línea silvestre Col-0. Como era de esperar, utilizando el gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34 como sonda en el análisis *Northern*, sólo se observó señal en las dos líneas transgénicas. En este sentido, la baja homología nucleotídica entre *Thpg1* y otros genes que codifican endoPGs de planta explicaba la ausencia de otras señales de hibridación en el carril que contenía el ARN de la línea silvestre Col-0. A su vez, el nivel de expresión fue mayor en la línea T2c1 que en la línea T2b1, estando el resultado de acuerdo con el número de copias insertadas, dos y una, respectivamente, como se dedujo del análisis *Southern*. La explicación más probable para el mayor nivel de expresión en la línea T2c1, sería que la banda de 4 kb fuera una copia truncada pero funcional, ya que la otra explicación sería que el número de inserciones en la misma región del genoma fuera mayor, pero parece poco probable debido a que la intensidad de la banda de 10 kb fue similar en ambos transformantes.

El bajo número de copias insertadas tras transformar *A. thaliana* con el gen *Thpg1* está de acuerdo con el observado en plantas de tabaco, transformadas con el gen *AnPGII* de *A. niger* (Capodicasa y col., 2004), y de manzano, que sobreexpresaban un gen que codifica una endoPG específica de fruto (Atkinson y col., 2002), respectivamente. No obstante, en este último caso, un mayor número de copias no fue acompañado de un mayor nivel de expresión del transgén.

Uno de los principales problemas que presenta la introducción de genes de hongo en planta es que durante el procesamiento de los transcritos se producen proteínas no funcionales debido a que parece que el péptido señal fúngico no es procesado por la maquinaria celular de la planta (Boudart y col., 2003). En nuestro caso, decidimos transformar utilizando el propio péptido señal de ThPG1, ya que estaba descrito que una planta de tabaco transformada con un gen que codifica una endoquitinasa de *T. harzianum*, portando el gen la parte nucleotídica relativa al péptido señal, secretaba una proteína funcional (Lorito y col., 1998). La actividad endopoligalacturonasa, medida en hojas liofilizadas, fue mayor en las dos líneas transgénicas que en Col-0, aunque la diferencia respecto a la línea silvestre fue sólo estadísticamente significativa para T2c1, siendo su actividad 3,5 veces mayor a la de Col-0. Los valores de actividad medidos en las líneas transgénicas demuestran que el transcrito del gen *Thpg1* estaría siendo procesado correctamente por la maquinaria de la planta.

Por otro lado, debemos tener en cuenta que las plantas de *A. thaliana* obtenidas por transformación con *Thpg1* estaban expresando una endoPG y es sabido que las plantas producen proteínas inhibitoras de poligalacturonasas (PGIPs). En este sentido, plantas de tabaco transformadas con la endoPG de *C. lindemuthianum*, *CLPG1*, y que no producían PGIPs frente a esta enzima, mostraron altos niveles de actividad (Boudart y col., 2003). Un análisis realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Giulia de Lorenzo (Universidad de Roma) con la proteína ThPG1 de *T. harzianum* T34 y con PGIPs de *A. thaliana* y *P. vulgaris* (datos no mostrados), reveló que eran necesarios 50 ng del inhibidor PvPGIP1 y 130 ng del PvPGIP2 de *P. vulgaris*, respectivamente, para inhibir 1 unidad de ThPG1 en un ensayo en placa de agarosa (Ferrari y col., 2003). Sin embargo, los dos PGIPs de *A. thaliana* ensayados no inhibían la proteína ThPG1 de *T. harzianum* T34. Este resultado está de acuerdo con otros trabajos en los que se ha descrito también que endoPGs de *A. niger* y *F. moniliforme* no son inhibidas por PGIPs de *A. thaliana* (De Lorenzo y Ferrari, 2002).

Por otra parte, la cantidad de PvPGIP2 necesaria para inhibir a ThPG1 fue muy superior a la que se necesitó para inhibir endoPGs de hongos fitopatógenos como *A. niger*, *F. moniliforme*, *C. acutatum* o *B. cinerea* (D'Ovidio y col., 2004b). Estos resultados determinan la importancia de la especificidad de la interacción entre endoPGs y PGIPs (De Lorenzo y Ferrari, 2002).

Una vez determinada la funcionalidad de la proteína ThPG1, se realizaron varios ensayos para comprobar el efecto de la expresión del gen *Thpg1* en *A. thaliana*. En un primer ensayo se comprobó el comportamiento de los transformantes frente a estreses abióticos de tipo osmótico (100 mM manitol) y salino (50 ó 100 mM NaCl). A pesar de que los porcentajes de germinación de semillas para las dos líneas transgénicas fueron inferiores a los mostrados por Col-0 en el medio MS (control), los valores fueron superiores cuando sus semillas se crecieron bajo condiciones de estrés, tanto osmótico como salino. En particular, la línea T2c1 mostró diferencias significativas en el porcentaje de germinación de semillas, respecto a Col-0, en las tres condiciones de estrés analizadas, mientras que para la línea T2b1 las diferencias con Col-0 sólo fueron estadísticamente significativas ante un estrés salino. También, los resultados mostraron que un aumento de las condiciones de estrés conlleva una mayor diferencia en resistencia respecto a Col-0. Estos resultados estarían de acuerdo con los mayores niveles de expresión de *Thpg1* observados en la línea T2c1. En este sentido, se ha observado una mayor resistencia a un estrés salino en plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen *XTH* que codifica una xiloglucan endotransglucosidasa/hidrolasa de pimiento (Cho y col., 2006). La proteína codificada por *XTH* está implicada en la modificación de la pared celular, al igual que lo están las endoPGs. Además las líneas T2b1 y T2c1 habían mostrado una alteración en su crecimiento.

Por otro lado, los resultados de los *microarrays* mostraban como la expresión de dos genes de *A. thaliana* que codifican enzimas relacionadas con el metabolismo de la

pared celular se veía afectada cuando una cepa de *T. harzianum* T34 silenciada en el gen *Thpg1* colonizaba la raíz de la planta. En este sentido, se podría pensar que la sobreexpresión de *Thpg1* en plantas de *A. thaliana*, a la vez que alterar la composición de la pared celular, induciría la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de la misma. La relación de *Thpg1* con una mayor resistencia a estreses abióticos, en las líneas transgénicas, podría explicarse por los cambios de porosidad de la pared debido a la modificación a la que se ve sometida la pectina por la acción de ThPG1 y de otras enzimas. Así, se han descrito fenotipos enanos y adaptaciones a estreses salinos e hídricos debidos a modificaciones en la composición de la pared celular (Iraki y col., 1989).

En cuando a la morfología de las líneas transgénicas, se observó un fenotipo enano que afectaba tanto a la parte aérea como a la raíz. Estos resultados están de acuerdo con aquellos obtenidos en plantas de *A. thaliana* ecotipo Wassilewskija, que expresaban el gen *pgII* que codifica una endoPG de *A. niger* (Capodicasa y col., 2004). Estos autores observaron que el fenotipo enano iba acompañado de una reducción del contenido de la planta en HGA. Todos los resultados indicarían que la alteración en el crecimiento observada en las líneas transgénicas es debida a la acción de la endoPG sobre la pared celular.

Por otro lado, considerando la posible relación entre ThPG1 y la resistencia a diferentes estreses abióticos, se realizó un análisis hormonal en las líneas transgénicas y en Col-0. Se pudo observar que los niveles de ABA y JA eran mayores en las dos líneas transgénicas que en la línea silvestre Col-0, pero sólo en T2c1 las diferencias eran significativas. Los mayores niveles de ABA y JA se han relacionado con una mayor resistencia a estreses osmóticos y salinos (LaRosa y col., 1985, 1987; Wang y col., 2001). También está descrito que los mayores niveles de ABA retrasan la germinación de las semillas y, en el presente trabajo, se ha observado menores porcentajes de germinación en las dos líneas transgénicas cuando se crecieron en un medio control (MS). Por tanto, la expresión constitutiva del gen *Thpg1* en plantas de *A. thaliana* estaría incrementando los niveles de estas dos hormonas, por lo que los mayores porcentajes de germinación obtenidos en las líneas transgénicas, bajo condiciones de estrés abiótico, se deberían a una mayor resistencia de las plantas a estos estreses.

Por otro lado, los niveles de SA fueron menores en las dos líneas transgénicas, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para ambas líneas. Así se ha descrito que la expresión constitutiva de una endoPG de *A. niger* en plantas de *A. thaliana* y tabaco, inducía la expresión de genes de defensa en éstas (Federici y col., 2007). A pesar de que en este trabajo no se determinaron los niveles hormonales, el aumento de los niveles de JA detectados en el presente estudio, podrían estar induciendo una ruta de defensa en la planta dependiente de esta hormona, pudiendo tener un efecto negativo sobre la producción de SA.

CONCLUSIONES

1. El gen *Thpg1*, que codifica una endopoligalacturonasa, se encuentra como copia única en el genoma de *T. harzianum* T34, y existe un gen homólogo en cepas pertenecientes a otras especies de *Trichoderma*. Además, la existencia en los genomas de *Trichoderma*, disponibles *on line*, de genes que codifican otras endopoligalacturonasas hipotéticas, sugiere que la cepa *T. harzianum* T34 posee otros genes que codifican este tipo de proteínas.
2. Los datos obtenidos en los estudios de expresión del gen *Thpg1* revelan que está inducido por componentes de la pared celular de las plantas como pectina o PGA, siendo éstos, a su vez, sustratos característicos de las endoPGs fúngicas.
3. La proteína ThPG1, que presenta una alta homología con endoPGs fúngicas, posee en su secuencia los aminoácidos típicos del dominio catalítico de las endoPGs de hongos.
4. La actividad poligalacturonasa detectada en los sobrenadantes obtenidos tras cultivar la cepa T34 en un medio mínimo suplementado con pectina al 0,5%, demuestra la capacidad enzimática de esta proteína para hidrolizar el ácido poligalacturónico.
5. La presencia en los transformantes ePG de la cepa T34 de al menos una copia adicional del gen *Thpg1*, junto a menores niveles de expresión y de actividad endopoligalacturonasa, demuestra que éstos están silenciados en el gen *Thpg1*.
6. La expresión del gen *Thpg1* en presencia de material vegetal relaciona este gen con procesos saprofiticos del hongo. Además, los resultados de los estudios de expresión génica y de análisis proteómico obtenidos en sistemas de tres componentes (*Trichoderma*-planta-patógeno) indican que el gen *Thpg1* es inducido por la pared celular de la planta y que la presencia de patógenos, fundamentalmente de raíz, incrementa la expresión del mismo.
7. Las diferencias observadas en los transcriptomas de *A. thaliana* colonizada por la cepa T34 o por el transformante ePG5, silenciado en el gen *Thpg1*, muestran que algunos genes relacionados con el metabolismo de la pared celular y con la defensa de la planta sólo son inducidos en presencia de la cepa T34. Estos resultados revelan la capacidad de *Thpg1* para activar mecanismos de defensa en las plantas.

8. Líneas de *A. thaliana* con al menos una copia del gen *Thpg1* de *T. harzianum* T34, presentaron expresión del mismo, así como una mayor actividad endopoligalacturonasa que la cepa silvestre Col-0. Estos resultados demuestran que son líneas transgénicas y la proteína ThPG1 es funcional en *A. thaliana*.
9. El fenotipo enano observado en las líneas transgénicas T2b1 y T2c1 de *A. thaliana*, parece indicar que la proteína ThPG1 provoca alteraciones en la pared celular de la planta a nivel estructural.
10. El menor porcentaje de germinación de semillas, observado en condiciones control, en las líneas transgénicas de *A. thaliana*, así como la mayor resistencia de las mismas a estreses abióticos, guarda relación con el incremento de sus niveles de ABA. Los mayores niveles de JA y menores de SA detectados en las líneas transgénicas sugieren que ThPG1 podría estar relacionada con la regulación de las defensas de la planta.

APÉNDICE

SECUENCIA DEL GEN *Thpg1* Y SU PROMOTOR

```

1  ttcattcttattttcgttttttcccatcataacctcttattcgatacctatagtagagctgaagttgatcgtcataagatcaatgaatgtaagacgcagt 100
101 tctcacatcaagtttcacgaatatactgaggagaactcccgtatgtaaacactcttttgtaattgagctactcccaaaaggattttataaccgaatcagg 200
201 gtatatgattggcagctacggctcaaattatgcaagtcggataagtaaataccgaagcgcgacctgctgcatacggcccggaataatcccaggcatc 300
301 ggattggtgctgttttgggcttaatttgcggctgtaacttcaagaagatcttataataatagaatccgggggtttacctacttgaataactcgatcggat 400
401 gcatcgggcaccaaaactggttgggtggaagatgtgggtatgtggcgatcaaatggcttttgaacgacaaaaacttgcgaagcatttgtttttcccc 500
501 ctattatctgtttcacaatgcctttataatgtcgtattttatcctgcagaggcccaatattgcatagtcctcataaagttgggttgcgttcataaaact 600
601 caacttcaaaacggcgcaaatatgaggtctcgatcctgaactatagactacagcctgttctccaacagcctgagatcatgacatgtagtttataata 700
701 cagggggttgacatctatataactctgcctgatccccattgtcaagtaccaagaagctgagaagctcatcgactcatcaagataataaaacttacatcaaaa 800
801 agtgtatacaac ATG ACC AAA CTA TCC CTT CTC CTC GGA GCG CTC GCA GCA TCG GTC TGT GTT CAA TCC CAT GCT CTT 878
1  M T K L S L L L G A L A A S V C V Q S H A L 22
879 CCA TCT CCT CCT ACA GTT ACA CAA GCA CCC GAG CTT GAA GAT CGA GCT ACT ACT TGC ACT TTC TCT GGT GCC AAT 953
23 P S P P T V T Q A P E L E D R A T T C T F S G A N 47
954 GGA GCA TCT TCA GCA AGC AAG TCG CAG AAG TCG TGC GCT ACC ATC GTG CTG TCA AAT GTT GCT GTC CCT TCG GGT 1028
48 G A S S A S K S Q K S C A T I V L S N V A V P S G 72
1029 GTG ACT CTC GAT CTT AGT GAC TTG AAT GAT GGC ACT ACT gttgagtaataactaaaatgacaaaattagacgcgcaatacaacgata 1114
73 V T L D L S D L N D G T T 86
1115 ctgattagacggctttttaaactatag GTC ATT TTT CAG GGG ACC ACT ACT TGG GGC TAC AAG GAG TGG TCT GGC CCT CTG 1195
87 V I F Q G T T T W G Y K E W S G P L 103
1196 CTC CAA ATC GAG GGC AAT GAT ATC ACC ATC CAG GGT GCC AGT GGT TCA GTT TTG GAT CCC CAG GGC TCC CGT TGG 1270
104 L Q I E G N D I T I Q G A S G S V L D P Q G S R W 128
1271 TGG GAT GGC GAA GGC AGC AAC GGT GGC AAG ACG AAG CCA AAG TTC TTT GCT GCT CAT GAT CTA ACC CCT TCA TCC 1345
129 W D G E G S N G G K T K P K F F A A H D L T P S S 153
1346 ATC ACC AAC CTG AAC ATC AGG AAC ACA CCT GTC CAA GCC GTC AGC GTG AAT GGT GTC AAT GGA CTT ACC ATC ACT 1420
154 I T N L N I R N T P V Q A V S V N G V N G L T I T 178
1421 GGA ATG ACA ATT GAC AAC AGT GCT GGT GAC AGT GGT GGC GGC CAC AAC ACC GAC GGA TTT GAC ATT GGC TCT AGC 1495
179 G M T I D N S A G D S G G G H N T D G F D I G S S 203
1496 TCG AAT GTT GTC ATT AGC GGA GCC AAA GTT TAT AAC CAA GAT GAC TGC GTT GCC GTC AAC TCT GGA ACA gtaagtca 1572
204 S N V V I S G A K V Y N Q D D C V A V N S G T 226
1573 ctttctactgaagatcaagaagctgaggaaattcttgactaaacaatatag AAC ATC ACA TTC ACT GGA GGT CTT TGC TCT GGT GGA 1660
227 N I T F T G G L C S G G 238
1661 CAT GGA TTG TCA ATC GGT AGC GTC GGC GGC CGA GAT GAC AAC ACT GTT CAA ACA GTT ACT TTT AGC AAC TCG CAG 1735
239 H G L S I G S V G G R D D N T V Q T V T F S N S Q 263
1736 GTT ACC AAG TCA GCC AAT G gtaagtcgttttagagaaatctagtttttttagattattgactaagcactttacag GC ATT CGT ATC AAG 1823
264 V T K S A N G I R I K 274
1824 GCA TCG GCT GGT GAT ACC GGG ACA ATC AAG GGA GTG ACC TAC ACA GGT ACT ACT CTG TCG GGC ATC ACG GG gtagt 1899
275 A S A G D T G T I K G V T Y T G T T L S G I T G 298
1900 ccaccgtccaatccattaatttagctcattaataacctgtgactcacag A TAT GGT ATT CTT ATT GAG CAA AAC TAC GAT GGT GGT 1986
299 Y G I L I E Q N Y D G G 310
1987 GAC CTG CAC GGA AGC CCC ACG AGC GGT ATC CCC ATT ACC AAC CTC GTA CTC CAG AAC ATC TCT GGA AGT GGC GGC 2061
311 D L H G S P T S G I P I T N L V L Q N I S G S G G 335
2062 GTC TTA TCA AGC GCC AAC AAT ATC GCC GTC GTT TGT GGA AGT GGA GCT TGT TCT AGC TGG ACC TGG AGC AAC GTC 2136
336 V L S S A N N I A V V C G S G A C S S W T W S N V 360
2137 GTC GTC ACT GGA GGA AAG AAA TAT GGC AGC TGC CAG AAC GTA CCA AGT GTT GCT ACT TGT TAA 2199
361 V V T G G K K Y G S C Q N V P S V A T C * 381

```

BIBLIOGRAFÍA

Andrianopoulos, A. y Hynes, M. J. (1990). Sequence and functional analysis of the positively acting regulatory gene *amdR* from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **10**, 3194-3203.

Agarwal, M., Sahi, C., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, S., Young, T., Gallie, D. R., Sharma, V. M., Ganesan, K., y Grover, A. (2003). Molecular characterization of rice *hsp101*: complementation of yeast *hsp104* mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. *Plant Mol Biol* **51**, 543-53.

Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E. y Llobell, A. (2001). Molecular and antifungal properties of an α -1,3-glucanase, AGN13.1, from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5833-5839.

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

Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C., Ecker, J. R. (2003). Genome wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-7.

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

Annis, S. E. y Goodwin, P. H. (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 1-14.

Arisan-Atac, I., Heidenreich, E. y Kubicek, C. P. (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.

Armand, S., Wagemaker, M. J., Sánchez-Torres, P., Kester, H. C., van Santen, Y., Dijkstra, B. W., Visser, J. y Benen, J. A. (2000). The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 691-6.

Arvas, M., Pakula, T., Lanthaler, K., Saloheimo, M., Valkonen, M., Suortti, T., Robson, G. y Penttila, 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.

Atkinson, R. G., Schröder, R., Hallett, I. C., Cohen, D. y MacRae, E. A. (2002). Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. *Plant Physiol.* **129**, 122-33.

Austin, R., Provart, N. J., Sacadura, N. T., Nugent, K. G., Babu, M. y Saville, B. J. (2004). A comparative genomic analysis of ESTs from *Ustilago maydis*. *Funct Integr Genomics* **4**, 207-218.

Ballance, D. J. (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* **2**, 229-236.

Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* **22**, 87-108.

Bayer, E. A., Shimon, L. J., Shonan, Y. y Lamed, R. (1998). Cellulosomes structure and ultrastructure. *J. Struct. Biol.* **124**, 221-34.

Bellincampi, D., Cardarelli, M., Zaghi, D., Serino, G., Salvi, G., Gatz, C., Cervone, F., Altamura, M. M., Costantino, P. y De Lorenzo, G. (1996). Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in *rolB*-transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the *rolB* gene. *Plant Cell* **8**, 477-487.

Benhamou, N. y Chet, I. (1993). Hypal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* **83**, 1062-1071.

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.

Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. y Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* **7**, 249-260.

Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc.* **57**, 289-300.

Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J. y Johnston, J. S. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100 Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of approximately 125 Mb. *Ann. Bot. (Lond)*. **91**, 547-57.

Biely, P., Benen, J., Heinrichová, K., Kester, H. C. y Visser, J. (1996). Inversion of configuration during hydrolysis of alpha-1,4-galacturonidic linkage by three *Aspergillus* polygalacturonases. *FEBS Lett.* **382**, 249-55.

Bisset, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot* **69**, 2357-2372.

Bittel, P. y Robatzek, S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 335-41.

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

Bläsing, O. E., Gibson, Y., Günther, M., Höhner, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W. R. y Stitt, M. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3257-81.

Bolar, J. P., Norelli, J. L., Harman, G. E., Brown, S. K. y Aldwinckle, H. S. (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus *Venturia inaequalis* in transgenic apple plants. *Transgen Res* **10**, 533-543.

Boudart, G., Charpentier, M., Lafitte, C., Martínez, Y., Jauneau, A., Gaulin, E., Esquerré-Tugayé, M. T. y Dumas, B. (2003). Elicitor activity of a fungal endopolygalacturonase in tobacco requires a functional catalytic site and cell wall localization. *Plant Physiol.* **131**, 93-101.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **62**, 248-254.

Brady, K. P., Darvill, A. G. y Albersheim, P. (1993). Activation of a tobacco glycine-rich protein gene by a fungal glucan preparation. *Plant J.* **4**, 517-24.

Bram, R. J., Lue, N. F. y Kornberg, R. D. (1986). A GAL family of upstream activating sequences in yeast: roles in both induction and repression of transcription. *Embo J.* **5**, 603-608.

Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S. y Kubicek, C. P. (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.

Buchanan, B. B., Gruissem, W. y Jones, R.L., Eds. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.

Bussink, H. J., Buxton, F. P. y Visser, J. (1991). Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigenensis* genes encoding polygalacturonase II. *Curr. Genet.* **19**, 467-74.

Bussink, H. J., Kester, H. C. y Visser, J. (1990). Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase II of *Aspergillus niger*. *FEBS Lett.* **273**, 127-30.

Calistru, C., McLean, M. y Berjak, P. (1997). *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathologia* **137**, 115-24.

Campbell, E. J., Schenk, P. M., Kazan, K., Penninckx, I. A., Anderson, J. P., Maclean, D. J., Cammue, B. P., Ebert, P. R. y Manners, J. M. (2003). Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* **133**, 1272-84.

Cao, L., Jiang, M., Zeng, Z., Du, A., Tan, H. y Liu, Y. (2008). *Trichoderma atroviride* F6 improves phyte extraction efficiency of mustard [*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey] in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere* **71**, 1769-73-

Capodicasa, C., Vairo, D., Zobotina, O., McCartney, L., Caprari, C., Mattei, B., Manfredini, C., Aracri, B., Benen, J., Knox, J. P., De Lorenzo, G. y Cervone, F. (2004). Targeted modification of homogalacturonan by transgenic expression of a fungal polygalacturonase alters plant growth. *Plant Physiol.* **135**, 1294-304.

Caprari, C., Bergmann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (1993). *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**, 453-462.

Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., Vizcaino, J. A., Gonzalez, F., Llobell, A., Monte, E. y Gutierrez, 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.*

Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., Vizcaíno, J. A., Sanz, L., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. En *Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol*. Mellado E. y Barredo J. L (eds). Research Signpost, Kerala, India. pp. 1-22.

Cardoza, R. E., Vizcaíno, J. A., Hermosa, M. R., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2006b). A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Microbiol* **44**, 383-395.

- Cardoza, R. E., Vizcaíno, J. A., Hermosa, M. R., Sousa, S., González, F. J., Llobell, A., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2006a). 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.
- Carvalho, A. y Moreira, V. (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology. A concise review. *Peptides* **28**, 1144-1153.
- Centis, S., Guillas, I., Séjalon, N. y Esquerré-Tugayé, M. T. (1997). Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of *CLPG2* and comparison of its expression to that of *CLPG1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 769-75.
- Chambergo, F. S., Bonaccorsi, E. D., Ferreira, A. J., Ramos, A. S., Ferreira Junior, J. R., Abrahao-Neto, J., Farah, J. P. y El-Dorry, H. (2002). Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem* **277**, 13983-13988.
- Chandrakanth, E., Garcia, J. M., Lopata-Finch, E., Pozo, M. J., Uribe, P., Dong-Jin Kim., Sunilkumar, G., Cook, D. R., Kenerley, C. M. y Rathore, K. S. (2003). Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Plant Biotechnol J* **1**, 321-336.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J. y Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol* **27**, 302-313.
- Chen, P. Y., Wang, C. K., Soong, S. C. y To, K. Y. (2003). Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol Breed* **11**, 287-293.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. I. Chet (ed). J. Willey y Sons, Nueva York, EE.UU. pp. 137-160.
- Chet, I., Benhamou, N. y Haran, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 2). Kubicek C. P. y Harman G. E. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. pp. 153-172.
- Chet, I., Harman, G. E. y Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microb Ecol* **7**, 29-38.
- Chet, I. y Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* **48**, 37-43.

Cho, S. K., Kim, J. E., Park, J. A., Eom, T. J. y Kim, W. T. (2006). Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *FEBS Lett.* **580**, 3136-44.

Clarke, M. C., Wei, W. y Lindsey, K. (1992). High-frequency transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol Report* **10**, 178-189.

Clough, S. J. y Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.

Conrath, U., Pieterse, C. M. y Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **7**, 210-216.

Cook, R. J. (1997). Biological control of soilborne plant pathogens: past, present and future. En *Proceedings of the International Symposium of Clean Agriculture*, pp. 35-48.

Coque, J. J., Álvarez-Rodríguez, M. L. y Larriba, G. (2003). Characterization of an inducible chlorophenol O-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5089-5095.

Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 850-61.

Cosio, I. G., Fisher, R. A. y Carroad, P. A. (1982). Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis, *J. Food Sci.* **47**, 901-905.

Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rascle, C. y Fèvre, M. (2003). Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett* **227**, 163-9.

Coutinho, P. M. y Henrissat, B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H. J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 3-12.

Dahiya, N., Tewari, R. y Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 773-782.

Dana, M.M., Pintor-Toro, J.A. and cubero, B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* **142**:722-730.

Davies, G. y Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-9.

- Deblaere, R., Bytebier, B., Degreve, H., Deboeck, F., Schell, J., Vanmontagu, M. y Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid derived vectors for *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**, 4777-4788.
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B. y Grafe, U.** (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J Pept Sci* **9**, 666-678.
- de la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benítez, T., Pintor-Toro, J. A. y Llobell, A.** (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur J Biochem* **206**, 859-867.
- de la Cruz, J. y Llobell, A.** (1999). Purification and properties of a basic endo-beta-1,6-glucanase (BGN 16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. *Eur J Biochem* **265**, 145-151.
- de la Cruz, J., Rey, M., Lora, J. M., Hidalgo-Gallego, A., Domínguez, F., Pintor-Toro, J. A., Llobell, A. y Benítez, T.** (1993). Carbon source control on β -glucanase, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch Microbiol* **159**, 316-322.
- Delgado-Jarana, J.** (2001). Producción de β -1,6-glucanasa II y genes regulados por pH en *Trichoderma harzianum*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Delgado-Jarana, J., Rincón, A. M. y Benítez, T.** (2002). Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiol* **148**, 1305-1315.
- Delgado-Jarana, J., Sousa, S., González, F., Rey, M. y Llobell, A.** (2006). ThHog1 controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiol* **152**, 1687-1700.
- De Lorenzo, G. y Ferrari, S.** (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defence against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 295-9.
- Deng, S., Lorito, M., Penttilä, M. y Harman, G. E.** (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.
- de Vries, R. P. y Visser, J.** (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 497-522.
- Diener, S. E., Dunn-Coleman, N., Foreman, P. y otros autores** (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.

- Di Pietro, A., García.Maceira, F. I., Huertas-González, M. D., Ruíz-Roldan, M. C., Caracuel, Z., Barbieri, A. S. y Roncero, M. I. (1998).** Endopolygalacturonase PG1 in different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1967-71.
- Di Pietro, A. y Roncero, M. I. (1998).** Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 91-8.
- Distefano, G., La Malfa, S., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z. y Gentile, A. (2008).** Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Res.* 10.1007/s11248-008-9172-9
- D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. y Bellincampi, D. (2004a).** Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1696**, 237-44.
- D'Ovidio, R., Raiola, A., Capodicasa, C., Devoto, A., Pontiggia, D., Roberti, S., Galletti, R., Conti, E., O'Sullivan, D. y De Lorenzo, G. (2004b).** Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defence against fungi and insects. *Plant Physiol.* **135**, 2424-35.
- Dower, W. J., Miller, J. F. y Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.
- Downs, C. G., Brady, C. J. y Gooley, A. (1992).** Exopolygalacturonase protein accumulates late in peach fruit ripening. *Physiol Plant* **85**, 133-140.
- Doyle, J. J. (1991).** DNA protocols for plants. En *Molecular Techniques in Taxonomy* Hewitt, G., Johnson, A. W. B. y Young, J. P. W. (eds). NATO ASI Series H, Cell Biology Vol. **57**. pp. 283-293.
- Dubordieu, D., Desplanques, C., Villettaz, J. C. y Ribereau-Gayon, P. (1985).** Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzainum*. *Carbohydr Res* **144**, 277-287.
- Dubos, B., Jailloux, F. y Bulit, J. (1982).** Protection du vignoble contre la pourriture grise: les propriétés antagonistes du *Trichoderma* à l'égard du *Botrytis cinerea*. *Colloques de l'INPA* **11**, 205-219.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J. V. y Gómez-Cadenas, A.** Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* **53**, 8437-42.
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. y Sharp, P. A. (2003).** Killing the meddenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 457-467.

- Ebbole, D. J., Jin, Y., Thon, M., Pan, H., Bhattarai, E., Thomas, T. y Dean, R. (2004).** Gene discovery and gene expression in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*: analysis of expressed sequence tags. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 1337-1347.
- Elad, Y., Barak, R. y Chet, I. (1984).** Parasitism of esclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol Biochem* **16**, 381-386.
- Elad, Y., Chet, I. y Hennis, Y. (1982).** Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* **28**, 719-725.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. y Tuschl, T. (2001).** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- El-Katatny, M. H., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M. A. y Gubitz, G. M. (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.
- Federici, L., Caprari, C., Mattei, B., Savino, C., Di Matteo, A., De Lorenzo, G., Cervone, F. y Tsernoglou, D. (2001).** Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13425-30.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fernandes, M., Xiao, H. y Lis, J. T. (1994).** Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* **22**, 167-173.
- Ferrari, S., Galletti, R., Pontiggia, D., Manfredini, C., Lionetti, V., Bellincampi, D., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (2008).** Transgenic expression of a fungal endo-polygalacturonase increases plant resistance to pathogens and reduces auxin sensitivity. *Plant Physiol.* **146**, 669-81.
- Ferrari, S., Vairo, D., Ausubel, F. M., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (2003).** Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell* **15**, 93-106.
- Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Fisher, F. y Goding, C. R. (1992).** Single amino acid substitutions alter helix-loop-helix protein specificity for bases flanking the core CANNTG motif. *Embo J.* **11**, 4103-4109.
- Fleet, G. H. y Phaff, H. J. (1974).** Glucanases in Schizosaccharomyces. Isolation and properties of the cell wall-associated beta(1 leads to 3)-glucanases. *J Biol Chem* **249**, 1717-1728.

Flores, A., Chet, I. y Herrera-Estrella, A. (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr Genet* **31**, 30-37.

Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L. y otros autores (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* **278**, 31988-31997.

Fraissinet-Tachet, L. y Fevre, M. (1996). Regulation by galacturonic acid of pectinolytic production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Microbiol.* **33**, 49-53.

Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P. y Fevre, M. (1995). Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Genet.* **29**, 96-9.

Freimoser, F. M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G. y St Leger, R. J. (2003). Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiol* **149**, 239-247.

Galante, Y. M., Monteverdi, R., Inama, S., Caldini, C., De Conti, A., Levelli, V. y Bonomi, F. (1993). New applications of enzymes in wine making and olive oil production. *Italian Biochem Soc Trans (IBST)* **4**, 34.

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

Gams, W. y Gräfenhan, T. (2006). Keynote Lecture: Highlights of progress and remaining problems in the taxonomy of *Trichoderma*. 4th ISTH Meeting, Viena (Austria) (<http://www.isth.info/meetings/tgm2006.php>)

Gao, S., Choi, G. H., Shain, L. y Nuss, D. L. (1996). Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major *in vitro* extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1984-90.

García, I., Lora, J. M., de la Cruz, J., Benítez, T., Llobell, A. y Pintor-Toro, J. A. (1994). Cloning and characterization of a chitinase (*chit42*) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **27**, 83-89.

García-Maceira, F. I., Di Pietro, A., Huertas-González, M. D., Ruíz-Roldán, M. C. y Roncero, M. I. (2001). Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2191-6.

- García-Maceira, F. I., Di Pietro, A. y Roncero, M. I. (2000).** Cloning and disruption of *pgx4* encoding an *in planta* expressed exopolysaccharuronase from *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 359-65.
- Ge, H., Walhout, A. J. y Vidal, M. (2003).** Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet* **19**, 551-560.
- Geremía, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S. B., Van Montagu, M. y Herrera-Estrella, A. (1993).** Molecular characterization of the proteinase encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol Microbiol* **8**, 603-613.
- Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H. P., Müller, C., Weisshaar, B. y Flügge, U. I. (2007).** The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **50**, 886-901.
- Goldman, G. H., Pellizzon, C. H., Marins, G. H., McInerney, J. O. y Goldman, M. H. S. (1998).** *Trichoderma* spp. genome and gene structure. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1). Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. pp. 209-224.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Sceibe, B., Widgruber, R. y Weiss, W. (2000).** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-1053.
- Götesson, A., Marchall, J. S., Jones, D. A. y Hardham, A. R. (2002).** Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 907-21.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., Monte, E. y García-Acha, I. (1997).** Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3189-3198.
- Grondona, I., Morales, R., Hermosa, M. R., Redondo, J., Rico, C., y Monte, E. (2001).** Biological control of *Rhizoctonia solani* in traditional-sowed and transplanted sugarbeet. *J Plant Pathol* **83**, 483-485.
- Hadfield, K. A. y Bennett, A. B. (1998).** Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiol.* **117**, 337-43.
- Hahn, M. G., Darvill, A. G. y Albersheim, P. (1981).** Host-Pathogen Interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* **68**, 1161-1169.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Handelsman, J. y Stabb, E. V. (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *Plant Cell* **8**, 1855-1869.

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

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

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

Harmsen, J. A., Kusters-van Someren, M. A. y Visser, J. (1990). Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene (*pelA*): indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*. *Curr. Genet* **18**, 161-6.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-16.

Herbert, C., Jacquet, C., Borel, C., Esquerré-Tugayé, M. T. y Dumas, B. (2002). A cis-acting sequence homologous to the yeast filamentation and invasion response element regulates expression of a pectinase gene from the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* **277**, 29125-31.

Herbert, C., O'Connell, R., Gaulin, E., Salesses, V., Esquerré-Tugayé, M. T. y Dumas, B. (2004). Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 140-7.

Hermosa, M. R., Grondona, I., Diaz-Minguez, J. M., Iturriaga, E. A. y Monte, E. (2001). 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, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E. y Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1890-1898.

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

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

Herron, S. R., Benen, J. A., Scavetta, R. D., Visser, J. y Jurnak, F. (2000). Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8762-9.

- Hjeljord, L. y Tronsmo, A. (1998).** *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 2). Harman, G. E. y Kubicek, C. P. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. pp. 131-153.
- Hoondal, G. S., Tiwari, R. P., Tewari, R., Dahiya, N. y Beq, Q. K. (2002).** Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 409-18.
- Howell, C. R. (2003).** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* **87**, 4-10.
- Howell, C. R. (2006).** Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* **96**, 178-180.
- Howell, C. R. y Stipanovic, R. D. (1995).** Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* **85**, 469-472.
- Hubbard, J. P., Harman, G. E. y 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, J. P., Lanthier, P., White, T. C., McHugh, S. G., Yaguchi, M., Roy, R. y Thibault, P. (2001).** Characterization of cellobiohydrolase I (Cel7A) glycoforms from extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **752**, 349-368.
- Ilmen, M., Thrane, C. y Penttila, 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. (1995).** The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* **141** (Pt 11), 2823-2829.
- 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. y Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Iraki, N. M., Singh, N., Bressan, R. A. y Carpita, N. C. (1989).** Cell Walls of Tobacco Cells and Changes in Composition Associated with Reduced Growth upon Adaptation to Water and Saline Stress. *Plant Physiol.* **91**, 48-53.

- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B. y Speed, T. P. (2003).** Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* **31**, e15.
- Ishii, T., Matsunaga, T. y Hayashi, N. (2001).** Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. *Plant Physiol.* **126**, 1698-705.
- Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M. y Yamamoto, H. (2001).** Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot: caused by *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Micro. Interact.* **6**, 749-757.
- Jakupovic, M., Heintz, M., Reichmann, P., Mendgen, K. y Hahn, M. (2006).** Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Fungal Genet Biol* **43**, 8-19.
- Jones, D. T. (1999).** Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**, 195-202.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. y Tewari, R. (2001).** Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* **77**, 215-27.
- Kasza, Z., Vagvölgyi, C., Fèvre, M. y Cotton, P. (2004).** Molecular characterization and in planta detection of *Sclerotinia sclerotiorum* endopolygalacturonase genes. *Curr. Microbiol* **48**, 208-13.
- Katayama, A. y Matsumura, F. (1993).** Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulphan, by *Trichoderma harzianum*. *Environ Toxicol Chem* **12**, 1059-1065.
- Kemp, G., Stanton, L., Berqmann, C. W., Clay, R. P., Albersheim, P. y Darvill, A. (2004).** Polygalacturonase-inhibiting proteins can function as activators of polygalacturonase. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 888-94.
- Keon, J., Antoniw, J., Rudd, J., Skinner, W., Hargreaves, J. y Hammond-Kosack, K. (2005).** Analysis of expressed sequence tags from the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). *Fungal Genet Biol* **42**, 376-389.
- Keon, J. P. R., Byrde, R. J. W. y Cooper, R. M. (1987).** Some aspects of fungal enzymes that degrade plant cell walls. In: Pegg GF and Ayres PG (eds) *Fungal Infection of Plants* (pp. 133-157) University Press, Cambridge.
- Kester, H. C., Kusters-van Someren, M. A., Müller, Y. y Visser, J. (1996).** Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. *Eur. J. Biochem.* **240**, 738-46.
- Khanh, N. O., Ruttkowski, E., Leidinger, K., Albrecht, H. y Gottschalk, M. (1991).** Characterization and expression of a genomic pectin methyl esterase-encoding gene in *Aspergillus niger*. *Gene* **106**, 71-7.

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

Kjaerulff, S., Dooijes, D., Clevers, H. y Nielsen, O. (1997). Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S. pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *EMBO* . **16**, 4021-33.

Klein, D. y Eveleigh, D. E. (1998). Ecology of *Trichoderma*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1). Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (eds). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido. pp. 57-74.

Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P. y Druzhinina, I. S. (2007). Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7415-26.

Kubicek, C. P., Bissett, C., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C. M. y Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol* **38**, 310-319.

Kubicek, C., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. y Kubicek-Pranz, E. M. (1990). *Trichoderma reesei* cellulases: biodiversity, genetics, physiology and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.

Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K. y Lorito, M. (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J Plant Pathol* **83**, 11-23.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T. y Kubicek, C. P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7755-7760.

Kulmburg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J. y Felenbok, B. (1993). Specific binding sites in the alcR and alcA promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **7**, 847-857.

Kullnig-Gradinger, C., Mach, R. L., Lorito, M. y Kubicek, C. P. (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2232-2234.

Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G. y Kubicek, C. (2000). Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol Res* **104**, 1117-1125.

- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. y Nei, M. (2001).** MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-5.
- Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel., Cimerman, A., Zotti, C., Moreau, E., Vedel, R., Pugin, A. y Boccara, M. (2006).** Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytol.* **170**, 537-50.
- Kuo, M. C. y Grayhack, E. (1994).** A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol. Cell Biol.* **14**, 348-59.
- Kyte, J. y Doolittle, R. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Biological Chemistry* **157**, 105-132.
- Lang, C. y Dörnenburg, H. (2000).** Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 366-75.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E. W. y Lee, Y. (2005).** AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**, 827-36.
- Lee, S. H., Kim, B. G., Kim, K. J. y other authors (2002).** Comparative analysis of sequences expressed during the liquid-cultured mycelia and fruit body stages of *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet Biol* **35**, 115-134.
- Lewis, J. A. y Papavizas, G. C. (1984).** A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology* **74**, 1240-1244.
- Li, D. C. (2006).** Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* **161**, 345-360.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I. y Petrini, O. (1999).** A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl Environ Microbiol* **65**, 2418-2428.
- Lim, M. S. y Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2004).** Proteomics in pathology research. *Lab Invest* **84**, 1227-1244.
- Limón, M. C. y Benítez, T. (2002).** Function and regulation of fangal chitinases. *Recent Res Devel Genet* **2**, 97-119.
- Limón, M. C., Chacón, M. R., Mejías, R., Delgado-Jarana, J., Rincón, A. M., Codón, A. C. y 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, M. C., Lora, J. M., García, I., de la Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T. y Pintor-Toro, J. A. (1995).** Primary structure and expresión pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **28**, 478-483.
- Limón, M. C., Pintor-Toro, J. A. y Benítez, T. (1999).** Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* **89**, 254-261.
- Liu, P. G. 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.
- Lo, C. T., Nelson, E. B. y Harman, G. E. (1996).** Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* **80**, 730-741.
- López-Errasquin, E. y Vázquez, C. (2003).** Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere* **50**, 137-143.
- Lora, J. M., de la Cruz, J., Llobell, A., Benítez T. y Pintor-Toro, J. A. (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.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. y Kubicek, C. P. (1996a).** Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* **178**, 6382-6385.
- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L. y Di Pietro, A. (1993).** Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* **83**, 302-307.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Woo, S. L. y Harman, G. E. (1994a).** Purification, characterization and synergistic activity of a glucan β -1,3-glucosidase and a N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **84**, 302-307.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Zoina, A., Scala, F., Del Sorbo, G., Woo, S. L. y Harman, G. E. (1994b).** Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides. *Mol Biotechnol* **2**, 209-217.
- Lorito, M., Woo, S. L., Donzelli, B. y Scala, F. (1996b).** Synergistic, antifungal interactions of chitinolytic enzymes from fungi, bacteria and plants. En *Chitin Enzymology* (vol. 2). Muzzarelli, R. A. A. (ed). Atec Edizioni, Italia, pp. 3034-3041.
- Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S. y Scala, F. (1998).** Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7860-7865.

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

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

Mach, R. L. y Zeilinger, S. (1998). Genetic transformation of *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.1). Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. pp. 225-242.

Maeda, H., Sano, M., Maruyama, Y. y otros autores (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**, 6491-501.

Maldonado-Mendoza, I. E., Dewbre, G. R., Blaylock, L. y Harrison, M. J. (2005). Expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, Mt-XTH1, from *Medicago truncatula* is induced systemically in mycorrhizal roots. *Gene* **345**, 191-7.

Markovic, O. y Janecek, S. (2001). Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Eng.* **14**, 615-31.

Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Roucco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turrà, D., Fogliano, V., Scala, F. y Lorito, M. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr. Genet.* **50**, 307-321.

Martens-Uzunova, E. S., Zandleven, J. S., Benen, J. A., Awad, H., Kools, H. J., Beldman, G., Voragen, A. G., Van den Berg, J. A. y Schaap, P. J. (2006). A new group of exo-acting family 28 glycoside hydrolases of *Aspergillus niger* that are involved in pectin degradation. *Biochem. J.* **400**, 43-52.

Martínez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P. M., Cullen, D., Danchin, E. G., GRigoriev, I. V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C. P., Han, C. S., Ho, I., Larrondo, L. F., de Leon, A. L., Magnuson, J. K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putman, N., Robbertse, B., Salamov, A. A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C. L., Yao, J., BArbote, R., Nelson, M. A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C. R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D. S., Lucas, S. M., Rubin, E. M., Dunn-Coleman, N., Ward, M. y Brettin, T. S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* **26**, 553-60.

Martínez C., Blanc F., Le Claire E., Besnard O., Nicole M. y Baccou J. C. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* **127**, 334–344.

Mauro, M. L., De Lorenzo, G., Costantino, P. y Bellincampi, D. (2002). Oligogalacturonides inhibiting the induction of late but not of early auxin responsive genes in tobacco. *Planta* **215**, 494-501.

Mead, J., Bruning, A. R., Gill, M. K., Steiner, A. M., Acton, T. B. y Vershon, A. K. (2002). Interactions of the Mcm1 MADS box protein with cofactors that regulate mating in yeast. *Mol. Cell Biol.* **22**, 4607-21.

Migheli, Q., González-Candelas, L., Dealessi, L., Camponogara, A. y Ramón-Vidal, D. (1998). Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the β -1,4-Endoglucanase gene *eglI* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Biol Control* **88**, 673-677.

Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.

Mohamed, S. A., Christensen, T. M. y Mikkelsen, J. D. (2003). New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylates pectins. *Carbohydr. Res.* **338**, 515-24.

Mohamed, S. A., Farid, N. M., Hossiny, E. N. y Bassuiny, R. I. (2006). Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *J. Biotechnol.* **127**, 54-64.

Mondal, K. K., Chatterjee, S. C., Viswakarma, N., Bhattacharya, R. C. y Grover, A. (2003). Chitinase-mediated inhibitory activity of *Brassica* transgenic on growth of *Alternaria brassicae*. *Curr Microbiol* **47**, 171–173.

Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between agricultural biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* **4**, 1-4.

Montero, M., Sanz, L., Rey, M., Llobell, A. y Monte, E. (2007). Cloning and characterization of *bgn16.3*, coding for a β -1,6-glucanase expressed during *Trichoderma harzianum* mycoparasitism. *J Appl Microbiol* **103**, 1291–1300.

Montero, M., Sanz, L., Rey, M., Monte, E. y 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, R.E., Gutiérrez, S., Monte, E. and Hermosa, R. (2007). The heterologous overexpression of *hsp23*, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. *Current Genetics* **52**, 45-53.

- Mora, A. y Earle, E. D. (2001).** Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl Environ Microbiol* **55**, 306-310.
- Mousavi, A. y Hotta, Y. (2005).** Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **120**, 169-74.
- Mukherjee, M., Hadar, R., Mukherjee, P. K. y Horwitz, B. A. (2003).** Homologous expression of a mutated β -tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *J Appl Microbiol* **95**, 861-867.
- Murashige, T. y Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* **15**, 473 - 497.
- Muthumeenakshi, S., Mills, P. R., Brown, A. E. y Seaby, D. A. (1994).** Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiol* **140**, 769-777.
- Nakai, K. y Horton, P. (1999).** PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- Napoli, C., Lemieux, C. y Jorgensen, R. (1990).** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- Navazio, L., Baldan, B., Moscatiello, R., Zuppini, A., Woo, S. L., Mariani, P. y Lorito, M. (2007).** Calcium-mediated perception and defence responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biol.* **7**, 41.
- Nelson, M. A., Kang, S., Braun, E. L. y other authors (1997).** Expressed sequences from conidial, mycelial, and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **21**, 348-363.
- Neumann, M. J. y Dobinson, K. F. (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.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. (1997).** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Nugent, K. G., Choffe, K. y Saville, B. J. (2004).** Gene expression during *Ustilago maydis* diploid filamentous growth: EST library creation and analyses. *Fungal Genet Biol* **41**, 349-360.

- Oeser, B., Heidrich, P. M., Müller, U., Tudzynski, P. y Tenberge, K. B. (2002). Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genet. Biol.* **36**, 176-86.
- Osteryoung, K. W., Toenjes, K., Hall, B., Winkler, V. y Bennett, A. B. (1990). Analysis of tomato polygalacturonase expression in transgenic tobacco. *Plant Cell* **2**, 1239-48.
- Pagès, S., Heijne, W. H., Kester, H. C., Visser, J. y Benen, J. A. (2000). Subsite mapping of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 29348-53.
- Panabieres, F., Amselem, J., Galiana, E. y Le Berre, J. Y. (2005). Gene identification in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica* during in vitro vegetative growth through expressed sequence tags. *Fungal Genet Biol* **42**, 611-623.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology and potential for biological control. *Annu Rev Phytopathol* **19**, 332-349.
- Parenicová, L., Benen, J. A., Kester, H. C. y Visser, J. (2000a). *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem J.* **3**, 637-44.
- Parenicová, L., Kester, H. C., Benen, J. A. y Visser, J. (2000b). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS Lett.* **467**, 333-6.
- Paterson, R. R. M. y Bridge, P. D. (1994). Biochemical techniques for filamentous fungi. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- Paulitz, T. C. (1990). Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. En *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Baker, R. R. y Dunn, P. E. (eds). Alan R. Liss, Nueva York, EE.UU. pp.713-724.
- Pearson, W. R. y Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2444-2448.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Ratto, M., Salminen, E. y Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungi *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**, 155-164.
- Persoon, C. H. (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.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2003-2007.
- Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K. y Jenkins, J. (1998). Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *J. Biol. Chem.* **273**, 24660-4.

Pressey, R. y Reger, B. J. (1989). Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. *Plant Sci.* **59**, 57-62.

Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. y 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.

Raiola, A., Sella, L., Castiglioni, C., Balmas, V. y Favaron, F. (2008). A single amino acid substitution in highly similar endo-PGs from *Fusarium verticillioides* and related *Fusarium* species affects PGIP inhibition. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 776-89.

Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., Gorton, D., Arst, H. N., Jr. y 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.

Raeder, U. y Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* **1**, 17-20.

Redman, J. C., Haas, B. J., Tanimoto, G. y Town, C. D. (2004). Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. *Plant J.* **38**, 545-61.

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

Rensink, W. A. y Buell, C. R. (2005). Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends Plant Sci.* **10**, 603-9.

Rey, M., Llobell, A., Monte, E., Scala, F. y Lorito, M. (2004). Genomics of *Trichoderma*. En *Fungal genomics applied mycology and biotechnology*. (Vol 4). Kachaturians, G.G (ed). Elsevier Science, Amsterdam, Holanda. pp. 225-248.

Reymond, P., Grünberger, S., Paul, K., Müller, M. y Farmer, E. E. (1995). Oligogalacturonide defence signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4145-9.

Reymond-Cotton, P., Fraissinet-Tachet, L. y Fèvre, M. (1996). Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase *pg1* gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. *Curr. Genet.* **30**, 240-5.

Ridley, B. L., O'Neill, M. A. y Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-67.

- Rifai, M. A. (1969).** A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* **1**, 1-56.
- Ringli, C., Keller, B. y Ryser, U. (2001).** Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 1430-41.
- Rocha-Ramirez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. A. y Herrera-Estrella, A. (2002).** Trichoderma atroviride G-protein alpha-subunit gene tgal is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell* **1**, 594-605.
- Rollins, J. A. (2003).** The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene is required for development and virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 785-95.
- Romano, N. y Macino, G. (1992).** Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* **6**, 3343-3353.
- Roper, M. C., Grve, L. C., Warren, J. G., Labavitch, J. M. y Kirkpatrick, B. C. (2007).** *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 411-9.
- Rosado, I. V., Rey, M., Codón, A. C., Govantes, J., Moreno-Mateos, M. A. y Benítez, T. (2007).** QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genet Biol* **44**, 950-964.
- Runinelli, P., Hu, Y. y Ma, H. (1998).** Identification, sequence analysis and expression studies of novel anther-specific genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **37**, 607-19.
- Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E. y Monte, E. (2005).** Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microb Ecol* **49**, 25-33.
- Rubio, M. B. (2007).** Aproximación al sistema cutinolítico de *Trichoderma harzianum*. Caracterización y análisis funcional del gen *Thcut1* y del factor de transcripción *Thctfl*. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
- Sahai, A. S. y Manocha, M. S. (1993).** Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* **11**, 317-338.
- Salinas, J. y Sánchez Serrano, J. J. (2006).** *Arabidopsis* protocols. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 323). 2ª edición. Humana Press, Totowa, EE.UU.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.

- Samuels, G. J. (1996).** *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* **100**, 925-935.
- Sander, L., Child, R., Ulvskov, P., Albrechtsen, M. y Borhardt, B. (2001).** Analysis of a dehiscence zone endo-polygalacturonase in oilseed rape (*Brassica napus*) and *Arabidopsis thaliana*: evidence for roles in cell separation in dehiscence and abscission zones, and in stylar tissues during pollen tube growth. *Plant Mol. Biol.* **46**, 469-79.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T. y otros autores (1978).** The nucleotide sequence of bacteriophage phiX174. *J Mol Biol* **125**, 225-246.
- Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J. A., Llobell, A., Hermosa, R. y Monte, E. (2004).** Cell-wall degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr Genet* **46**, 277-286.
- Sanz, L., Montero, M., Redondo, J., Llobell, A. y Monte, E. (2005).** Expression of an alpha-1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS J* **272**, 493-499.
- Scazzocchio, C. (2000).** The fungal GATA factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 126-31.
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E. y Kubicek, C. P. (1994).** Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol.* **60**, 4364-4370.
- Schulze, A. y Downward, J. (2001).** Navigating gene expression using microarrays—a technology review. *Nat. Cell Biol.* **3**, 190-5.
- Scott-Craig, J. S., Cheng, Y. Q., Cervone, F., De Lorenzo, G., Pitkin, J. W. y Walton, J. D. (1998).** Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1497-503.
- Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Cervone, F. y Walton, J. D. (1990).** Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell* **2**, 1191-200.
- Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B. y Kubicek, C. P. (2005).** A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J* **272**, 5923-39.
- Seidl, V., Seiboth, B., Karaffa, L. y Kubicek, C. P. (2004).** The fungal STRE-element-binding protein Seb1 is involved but not essential for glycerol dehydrogenase (gld1) gene expression and glycerol accumulation in *Trichoderma atroviride* during osmotic stress. *Fungal Genet Biol* **41**, 1132-1140.

- Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E. y Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* T34. *Proteomics* 7, 3943-52.
- Shaban, G. M. y El-Komy, H. M. (2001). Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. in Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. *Mycopathologia* 151, 139.
- Shaw, L. J., Morris, P. y Hooker, J. E. (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology* 8, 1867-1880.
- Sitrit, Y., Downie, B., Bennett, A. B. y Bradford, K. J. (1996). A novel exo-polygalacturonase is associated with radicle protrusion in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. (abstract no. 752). *Plant Physiol* 111, S-161.
- Sivasithamparam, K. y Ghisalberti, E. L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol 1). Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido, pp. 139-191.
- Skinner, W., Keon, J. y Hargreaves, J. (2001). Gene information for fungal plant pathogens from expressed sequences. *Curr Opin Microbiol* 4, 381-386.
- Smith, T. F. y Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 147, 195-197.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195, 19-23.
- Sousa, S. M. (2004). Mejora del sistema de expresión en *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la producción de proteínas de interés biotecnológico. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Spiro, M. D., Ridley, B. L., Eberhard, S., Kates, K. A., Mathieu, Y., O'Neill, M. A., Mohnen, D., Guern, J., Darvill, A., Albersheim, P. (1998). Biological activity of reducing end derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 116, 1289-98.
- Stasz, T. E., Nixon, K., Harman, G. E., Weeden, N. F. y Kuter, G. A. (1989). Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozymes polymorphism. *Mycologia* 81, 391-403.
- Stotz, H. U., Bishop, J. G., Bergmann, C. W., Koch, M., Albersheim, P., Darvill, A. G. y Labavitch, J. M. (2000). Identification of target amino acids that affect interactions of fungal polygalacturonases and their plant inhibitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56, 117-130.

- Stratilová, E., Dzúrová, M., Markovic, O. y Jörnvall, H. (1996). An essential tyrosine residue of *Aspergillus* polygalacturonase. *FEBS Lett.* **382**, 164-6.
- Stukkens, Y., Bultreys, A., Grec, S., Trombik, T., Vanham, D. y Boutry, M. (2005). NpPDR1, a pleiotropic drug resistance type ATP binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defence. *Plant Physiol.* **139**, 341-52.
- Suárez, M. B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E. y Llobell, A. (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**, 46-55.
- Suárez, M. B., Sanz, L., Chamorro, M. I., Rey, M., Gonzalez, F. J., Llobell, A. y Monte, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet Biol* **42**, 924-934.
- Suárez, M. B., Vizcaíno, J. A., Llobell, A. y Monte, E. (2007). Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Curr Genet* **51**, 331-342.
- Suykerbuyk, M. E., Schaap, P. J., Stam, H., Musters, W. y Visser, J. (1995). Cloning, sequence and expression of the gene coding for rhamnogalacturonase of *Aspergillus aculeatus*; a novel pectinolytic enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 861-70.
- Talamo, F., D'Ambrosio, C., Arena, S., Del Vecchio, P., Ledda, L., Zehender, G., Ferrara, L., Scaloni, A. (2003). Proteins from bovine tissues and biological fluids: defining a reference electrophoresis map for liver, kidney, muscle, plasma and red blood cells. *Proteomics* **3**, 440-60.
- Taylor, J. E., Tucker, G. A., Lasslett, Y., Smith, C. J. S., Arnold, C. M., Watson, C. F., Schuch, W., Grierson, D. y Roberts, J. A. (1990). Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic plants. *Planta* **183**, 133-138.
- ten Have, A., Breuil, W. O., Wubben, J. P., Visser, J. y van Kan, J. A. (2001). *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet. Biol.* **33**, 97-105.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (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.
- Trail, F., Xu, J. R., San Miguel, P., Halgren, R. G. y Kistler, H. C. (2003). Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet Biol* **38**, 187-197.

- Trigui-Lahiani, H. y Gargouri, A. (2007).** Cloning, genomic organisation and mRNA expression of a pectin lyase gene from a mutant strain of *Penicillium occinatis*. *Gene* **388**, 54-60.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. y Chu, G. (2001).** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 5116-21.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. Citovsky, V. (2004).** Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet.* **20**, 375-83.
- van Santen, Y., Benen, J. A., Schröter, K. H., Kalk, K. H., Armand, S., Visser, J. y Dijkstra, B. W. (1999).** 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 30474-80.
- Vázquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales, C. A. y Herrera-Estrella, A. (1998).** Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1442-1446.
- Viterbo, A., Haran, S., Friesem, D., Ramot, O. y Chet, I. (2001).** Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiol Lett* **200**, 169-174.
- Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A. y Chet, I. (2002a).** Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr Genet* **42**, 114-122.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chemin, L. y Chet, I. (2002b).** Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 549-556.
- Vizcaino, J. A., Gonzalez, F. J., Suarez, M. B. y otros autores (2006a).** Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genom* **7**, 193.
- Vizcaino, J. A., Redondo, J., Suárez, M. B., Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., González, F. J., Rey, M. y Monte, E. (2007).** Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *Appl Microbiol Biotech* **75**, 853-862.
- Vorwerk, S., Somerville, S. y Somerville, C. (2004).** The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* **9**, 203-9.
- Weber, K. y Osbern, M. (1975).** Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. En *The proteins* (vol. 1), pp. 179-221. Eds.: H. Neurath y R. L. Hill. Academic Press, New York.
- Weindling, R. (1932).** *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* **22**, 837-845.

- Whitehead, M. P., Shieh, M. T., Cleveland, T. E., Cary, J. W. y Dean, R. A. (1995).** Isolation and characterization of polygalacturonase genes (*pecA* and *pecB*) from *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3316-22.
- Wilhite, S. E., Lumsden, R. D. y Straney, D. C. (2001).** Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5055-5062.
- Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W. y Knox, J. P. (2001).** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol* **47**, 9-27.
- Williams, H. L., Tang, Y. y Hintz, W. E. (2002).** Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. *Fungal Genet. Biol.* **36**, 71-83.
- Woo, S. L., Ciliento, R., Piacenti, D., Hermosa, M. R., Scala, F., Zoina, A. y Lorito, M. (2001).** *Trichoderma* chitinases and the encoding genes as molecular tools for enhancing biocontrol. En *Chitin Enzymology*. Muzzarelli, R. A. A. (ed). Atec edizioni, Grottammare, Italia, pp. 47-55.
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. y Lorito, M. (2006).** The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* **96**, 181-185.
- Woosley, B. D., Kim, Y. H., Kumar-Kolli, V. S., Wells, L., King, D., Poe, R., Orlando, R. y Bergmann, C. (2006).** Glycan analysis of recombinant *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase A. *Carbohydr. Res.* **341**, 2370-8.
- Wray, L. V., Jr., Witte, M. M., Dickson, R. C. y Riley, M. I. (1987).** Characterization of a positive regulatory gene, LAC9, that controls induction of the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*: structural and functional relationships to GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 1111-1121.
- Wubben, J. P., Mulder, W., ten Have, A., van Kan, J. A. y Visser, J. (1999).** Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1596-602.
- Wubben, J. P., ten Have, A., van Kan, J. A. y Visser, J. (2000).** Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* **37**, 152-7.
- Yan, H. Z. y Liou, R. F. (2005).** Cloning and analysis of *pppg1*, an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 339-50.

- Yedidia, I., Benhamou, N. y Chet, I. I. (1999).** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1061-1070.
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y. y Chet, I. (2001).** Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* **235**, 235-242.
- Yoder, O. C. y Turgeon, B. G. (2001).** Fungal genomics and pathogenicity. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 315-321.
- 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. (2004).** Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr Genet* **45**, 54-60.
- Zelinger, S., Ebner, A., Marosits, T., Mach, R. y Kubicek, C. P. (2001).** The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within *cbh2* (Cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Mol. Genet. Genomics* **266**, 56-63.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M. y Kubicek, C. P. (1999).** Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet Biol* **26**, 131-140.