

R.19.450



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio.....40..... número.....113..... del libro
correspondiente. 05 ABR. 2001
Sevilla,.....

El Jefe del Negociado.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Producción de β -1,6-glucanasa II y
genes regulados por pH
en *Trichoderma harzianum***

TESIS DOCTORAL

**Jesús Delgado Jarana
Sevilla, 2001**

TD
113



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TD

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Producción de β -1,6-glucanasa II y genes regulados por pH en *Trichoderma harzianum* sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado:

JESÚS BELGADO
JARANA

Sevilla, a 13 de Septiembre de 2001
de 1999

**Producción de β -1,6-glucanasa II y
genes regulados por pH
en *Trichoderma harzianum***

**Trabajo presentado por el licenciado
Jesús Delgado Jarana
para optar al grado
de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla**

Sevilla 2001

**Directora del trabajo:
Tahía Benítez Fernández**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tahía Benítez Fernández', written in a cursive style.

**Dedicado a Ana María y Jesús, mis padres,
y a Ana Marí y Patri, mis hermanas**

Ítaca

Cuando salgas de viaje para Ítaca,
desea que el camino sea largo,
colmado de aventuras, colmado de experiencias.
A los lestrigones y a los cíclopes,
al irascible Posidón no temas,
pues nunca encuentros tales tendrás en tu camino,
si tu pensamiento se mantiene alto, si una exquisita
emoción te toca cuerpo y alma.
A los lestrigones y a los cíclopes,
al fiero Posidón no encontrarás,
a no ser que los lleves ya en tu alma,
a no ser que tu alma los ponga en pié ante ti.

Desea que el camino sea largo.
Que sean muchas las mañanas estivales
en que –¡y con qué alegre placer!–
entres en puertos que ves por vez primera.
Deténte en los mercados fenicios
para adquirir sus bellas mercancías,
madreperlas y nácares, ébanos y ámbares,
y voluptuosos perfumes de todas las clases,
todos los voluptuosos perfumes que te sean posibles.
Y vete a muchas ciudades de Egipto
y aprende, aprende de los sabios.

Mantén siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Pero no tengas la menor prisa en tu viaje.
Es mejor que dure muchos años
y que viejo al fin arribes a la isla,
rico por todas las ganancias de tu viaje,
sin esperar que Ítaca te va a ofrecer riquezas.

Ítaca te ha dado un viaje hermoso.
Sin ella no te habrías puesto en marcha.
Pero no tiene ya más que ofrecerte.
Aunque la encuentres pobre, Ítaca de ti no se ha burlado.
Convertido en tan sabio, y con tanta experiencia,
ya habrás aprendido el significado de las Ítacas.

C.P. Cavafis

Después de tantos años de vida debo tanto a tantas personas que tendría que escribir un volumen similar al que aquí termina. Con algunos me habré equivocado más de una vez. Como escribió Ernesto Sábato, “ay de aquél que no tenga en el fondo de su corazón algo de lo que arrepentirse”. Y no son ganas sino tiempo lo que me falta para poder corresponder a todos como se merecen. Sin embargo, sí quiero mencionar a algunas personas que, más o menos directamente, han influido sobre mi persona y mi trabajo, aunque muchas nunca me hayan visto coger una pipeta.

Muchas gracias

A Tahía, que un día me recibió en su despacho y me dio la oportunidad de hacer ciencia. Nos ha dado tiempo a discutir no sólo sobre experimentos, que eso no tiene mérito alguno, sino también sobre lo humano y lo divino, a conocernos, respetarnos, comprendernos y apreciarnos. Hemos compartido no sólo los sinsabores y las alegrías de esta forma de vida, sino también momentos inolvidables en algún que otro viaje y más de un restaurante. Por estar siempre a mi lado, gracias, Tahía.

A Luis Pérez, que hizo posible que yo disfrutara de una beca durante cuatro años. Ha sido un placer conocerle y escucharlo hablar del vino. Te debo muchas copas, Luis.

A José Antonio Pintor-Toro y Antonio Llobell, que siempre han estado dispuestos a escuchar mis numerosas dudas y a resolverlas. Me han inundado con su entusiasmo casi adolescente por esto de la ciencia.

A Daniel Ramón y Andrew MacCabe, que me han facilitado muchos experimentos que no están recogidos aquí. Espero que la tantas veces programada estancia en Valencia se haga realidad algún día. Aunque no sea para medir transporte.

A Manolo, que me acogió como “pequeño saltamontes” y me enseñó a disfrutar haciendo ciencia. Para mí ha sido un honor poder aprender a su lado, escuchar “El larguero” y “Hablar por hablar” apurando algún experimento antes de un congreso, sufrir los tiempos del “mal de Moctezuma” y de “La factoría”, etc. Es curioso pero, después de tanto, hemos conseguido ser algo más que compañeros de trabajo. Y en los tiempos que corren no es poco. Gracias por todo, Maestro.

Al resto de mis compañeros de laboratorio. A Carmen, de la que aprendí muchas cosas y a la que aprecio como la hermana mayor que no tengo. A Ana, porque si he llegado hasta aquí es gracias a ella y a la confianza que tuvo en mí. Es quien más cerca he tenido en los últimos cuatro años y es, por ello, coautora moral de este trabajo. Y de mi persona y mi vida. Gracias, canalla. A los muchos pequeños “que en el mundo han sido”: Mamá Yeni, More, Iván el quinqui, Javi, la Rebe, Fernandito y Lidia, a los que ahora sólo puedo pedir perdón por no haber sido el maestro que merecían. A todos por conservar la tradición de la Fitomerienda, para mayor gloria del batido de vainilla y del Cobreros. A Bea, que siempre estuvo dispuesta a discutir cualquier experimento y a contar anécdotas del Ancien Régime.

Me enseñó mucho y se lo agradezco de corazón. A los levaduros: ACC, Gasent y Paco. A Quique, que es como si siguiera siendo del grupo.

A los "primos" del IRNA. A Irene, Luis, Merche y Cristina. A Merche le debo muchas cosas, pero sobre todo que ha hecho que me sienta útil e importante cada vez que me preguntaba algo. Gracias. Porque estaba orgullosa de mí y me lo dijo. Por ser siempre un soplo del aire fresco de esta tierra. Tú sí que vales, prima. Gracias por tu rincón, gitanita, que es un poco mío. "La razón era la vida misma", escribió Ray Bradbury.

A los "cartujos". A Andrés, un figura de esto, que me ha explicado pacientemente todo lo que quise saber sobre la "cosa esa" de la bioquímica. A Hassane, que siempre se ríe. A Belén, leonesa en Sevilla, mi compi en la lucha de las proteasas, porque no me ha retirado la palabra después de todos los plantones. A Manolo Montero. A Andrea y los otros, que siempre estuvieron dispuestos a ayudar y a reír. A Sonia, mi cateta preferida. Con ella he compartido mi pasión por las β -1,6-glucanasas ;-). Cree en mí, y eso es impagable. Le debo alguna separata, por cierto. Eres especial, cate. Y tú lo sabes.

Después de seis años, he pasado de ser el último mono a alcanzar el hermoso status de Gran Montaña de Basura. Hemos compartido la vida del laboratorio, con lo larga que es. Pero además recordaré las obras de Navidad, los partidos y las cervezas de después, las fiestas, el comentado caso de las tripas en el congelador y también muchas penas y decepciones. Esto no es Macondo, pero lo parece. Pero lo más importante es que he conocido a personas que han ido construyendo lo que soy y lo que tengo. Tengo mucho que agradecer a Sonia, la Jimeno, por inducirme a algún que otro exceso etílico, a Anabeatriz, porque siempre respondió con sonrisas a mis bromas y por ser mi amiga. A Anabel ("quemamos con malas artes el espíritu del vino"), porque si llego a aprobar el CAP es por su empeño. A Don Pablo, por ayudarme a "arreglar" el mundo (cómo lo hemos dejado...). A Merceditas "la del guardarropa". A Bina, Santi y Rafa Fernández, porque hicieron la vida más alegre. A Paco Malagón, por existir. A Silvia, por sus consejos y sus "claras". A Sergio, por su optimismo inagotable. A Pablito, porque su capacidad es un estímulo. A Felipe, por mis abdominales. A Manuela, que me debe una cena gracias al futuro del subjuntivo. A Mari, por su incontenible verborrea en ciertos momentos y por no perderme el libro de Quevedo. A Luis (mi reino por un PC, Luigi), a Machupi, a Nabil, el killer del área, a Loubna, por el convertidor de la estufa, a Eduardinho, a Irino (¿o era Irina?), a Alfonso, a María del Mar, a David, a Pepi-Elo-Olga-Emilia-Belén, las niñas-NIF, por responder siempre a mis preguntas sobre bacterias y por convertir en una aventura el tener que ir a por enzimas de restricción, a Ángel Blokhin por su fútbol, al curso de quinto que tuve el placer de dar, y del que, cosas de la vida, aún conservo amigos, como María Ceballos (te debo un e-mail), Esteban, Paola, la srta. Quintanilla, Belén, el Criado, etc. En los otros cursos he conocido a mucha gente excepcional, como Luis López-Mauri. A los viejos del lugar, Fernan, Miguel, Nicolás, Carmencharo, Helenita, Javi Ruiz, Rafa Flores, Félix, Piru, Pepa, Joaquín (ay! nuestro Betis...), etc, porque siempre me trataron de igual a igual y me enseñaron mucho. Algunos me han hecho compañía en esos días y a esas horas en las que no se cruza uno con mucha gente en el pasillo. No había nadie para ayudarme y ellos estuvieron allí.

A mis compañeros de promoción, que merecen un lugar especial porque me aguantaron en aquel quinto curso inolvidable. Eran otros tiempos. Gracias a Eugenio (demonio!), Ricardo, Bea (mi primer poster), Raúl (te sigo admirando), Eva (a ti también), Jaime, Antonio Ruiz, Isa, África, Larita, Elena, Pili, Patricia, Conchi, Gamero, Sergio, Antonio Carrillo, Fernando, Lola (mi Lola...), Antonio Benítez, Mari Angeles, Dani, Inés, Fidel, a todos los de aquel equipo que hizo historia, etc. A María del Mar. Todos me empujaron hasta aquí. Muchas gracias. Pero tengo un recuerdo especial para Antonio y Sara, con los que he compartido algunas chimeneas y más de un paseo por el campo. Los admiro como científicos, que es poco. Los quiero como personas, que es mejor. Gracias por todo.

A mis profesores. Desde Sor Mari Angeles que me enseñó a leer, hasta ahora, he disfrutado de las enseñanzas de muy buenas personas. Me acuerdo de muchos, pero sobre todo de Cristóbal (un sustituto que me enseñó a amar la Biología) de Consuelo, Mari Cruz, Benigno (al que todavía estoy molestando), Juan Saa (por ganarme la batalla, porque así ganamos los dos), Mari Angeles Cantisán, María Dolores (al final me gustaron los idiomas), Angeles (porque sigo haciendo esquemas como ella me enseñó), Tom (y la física), etc. En la carrera he tenido el placer de recibir clases de profesores extraordinarios, como Fuco, Pepe Merino, José Carlos García, Quique y Tere (a los que agradezco mis primeros pasos en la ciencia), Ramón Bellogín y Concha, Eloy, Josefina y Angel (que me siguen aguantando, pero ahora en el microscopio), etc. A mis profesores del departamento de genética: Enrique, Tahía, Edu, Andrés, Antonio, Gabi, Luis, Javier (que ha sido un paciente vecino), Sebastián, Paco y ahora Jesús de la Cruz (maestro de maestros). Sobre todo a Isabel y Pepe, porque sus extraordinarias clases me convirtieron a esto de la genética.

He tenido también el apoyo del personal del departamento. De las secretarias, que han sufrido mis facturas y albaranes perdidos, así como mi falta absoluta de interés por toda la burocracia que anega a la ciencia: Ana y Gloria, gracias. A Pepe y Luis, porque hacen que esto sea más fácil y más divertido. Da gusto estar a su lado. Los echaré de menos. Seguro.

Algunas personas han hecho esto más agradable, aportando su granito de arena (media playa en algún caso) para que esto llegue a su fin (si llega). A Prado, que me cambió la vida. Gracias, Pradito. A mi "tío" Luis, mi capitán, que me procuró una "mili" de las buenas. A Anders, porque es un placer dejar de trabajar para hablar con él, aunque no le vaya a comprar nada. A mi cuñado Ale, porque lo que sé de buses, placas, memorias y micros se lo debo a su infinita paciencia delante de las tripas de mi PC. Y porque esto lo estoy escribiendo en el suyo porque el mío ha decidido dormir el sueño de los bytes.

A mis amigos. Por serlo. A Nacho, Justo, Juanjo, Pipo, Migue, Fran, Sr. Vergara, etc. Porque nunca dejaron de llamarme para cenar. Porque me aguantan deudas millonarias en las quinielas (¿será porque no nos toca?). Porque seguimos juntos desde hace veintitantos años. Porque los quiero.

A toda mi familia, que lo es todo para mí.

A Ana, "con quien tanto quise", a la que sólo puedo decirle aquello de:

“A las aladas almas de las rosas
del almendro de nata te requiero,
que tenemos que hablar de muchas cosas
compañero del alma, compañero.”

INTRODUCCIÓN

1. El género *Trichoderma*?

El concepto de especie de *Trichoderma* es muy impreciso (“Todavía no sabemos qué es una especie de *Trichoderma*”, Samuels (1996)). Existe, sin embargo, un consenso “general” de lo que constituye la morfología básica del género *Trichoderma*: crecimiento rápido, abundante esporulación, conidios verdes y conidióforos mal definidos.

La mayoría de la cepas de *Trichoderma* carecen de ciclo sexual conocido, de modo que son hongos clonales, con un ciclo exclusivamente mitótico. *Trichoderma*, sin embargo, tiene todas las características esenciales de anamorfos de ascomicetos del orden Hipocreales. Esto, que hasta hace un tiempo era considerado como una forzada relación estrictamente morfológica tiene una base molecular resultado del análisis de su ADN (Kuhls *et al.*, 1996) y de la estructura de su pared (Prieto *et al.*, 1997), al menos para el caso de *Hypocrea jecorina* y *Trichoderma reesei*. Podemos decir, por tanto, que *Trichoderma* es un hifomiceto sin ciclo sexual conocido, estando muchas de sus especies relacionadas con ascomicetos Hipocreales.

Desde la clasificación inicial determinada por Rifai (1969), se han producido numerosos cambios debido esencialmente a la aparición de las técnicas de biología molecular (Bulat *et al.*, 1998, Kindermann *et al.*, 1998) que, si bien confirman las coincidencias generales, introducen matices que desplazan cepas de una sección a otra, relacionándolas a veces con un teleomorfo de *Hypocrea* concreto.

En esta Tesis Doctoral, cuando nos referimos a *Trichoderma harzianum* CECT 2413 o a cualquiera de las otras cepas de *Trichoderma*, lejos de querer establecer ninguna afirmación sobre la sistemática de dichas especies, lo hacemos utilizando el nombre con el que están depositadas en las diversas colecciones, principalmente en la Colección Española de Cultivos Tipo.

2. *Trichoderma* como agente de control biológico

El interés principal de la mayoría de las cepas del género *Trichoderma* es su utilización como agente de control biológico (Papavizas, 1985, Benítez *et al.*, 1998b). Entendemos por control biológico, “la reducción de la cantidad del inóculo de un patógeno - o de la actividad que produce una enfermedad- debida a uno o más organismos a parte del hombre” (Hjeljord & Tronsmo, 1998). Muchas cepas de *Trichoderma*, especialmente *T. harzianum*, han sido descritas como antagonistas de hongos patógenos de plantas (Elad *et al.*, 1982, Elad *et al.*, 1983). *Trichoderma* también interacciona con otros organismos que no son hongos fitopatógenos, ya que causa enfermedades en plantas y en frutos e influye sobre la población de micorrizas.

Trichoderma ejerce el antagonismo sobre los hongos utilizando mecanismos tan diversos como el micoparasitismo, la antibiosis, la competición por los nutrientes o el espacio, la resistencia inducida en plantas, la solubilización y secuestro de nutrientes inorgánicos y la inactivación de los enzimas del patógeno (Harman, 2000).

El micoparasitismo

El micoparasitismo es el ataque directo de un hongo sobre otro (Chet *et al.*, 1998). Aunque algunos autores dividen el proceso en varios eventos sucesivos (crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, enrollamiento, lisis de la pared y asimilación del contenido de ésta y del citoplasma), muchos de estos procesos se producen simultáneamente e incluso pueden darse los últimos sin producirse los previos: *Trichoderma* puede producir enzimas líticas sin que haya contacto físico entre los dos hongos.

Algún estímulo de naturaleza desconocida induce a *Trichoderma* a crecer hacia el patógeno. Aunque la inhibición del crecimiento puede darse sin que los dos organismos lleguen a encontrarse físicamente, el hecho de que una misma cepa de *Trichoderma* sea capaz de parasitar a una determinada especie de hongo y no a

otra sugiere la existencia de algún proceso de reconocimiento (Haran et al., 1996a). Este papel se le ha asignado tradicionalmente a las lectinas (Elad et al., 1983). Las especies micoparásitas de *Trichoderma* poseen lectinas y azúcares, sobre todo galactosa, en su pared celular (Neethling & Nevalainen, 1996). Asimismo, se ha demostrado que tanto *Rhizoctonia solani* como *Sclerotium rolfisii*, dos importantes hongos patógenos, poseen en su pared lectinas cuyo bloqueo con los azúcares respectivos por los que tienen afinidad, bloquea el enrollamiento de *T. harzianum* o la adsorción de conidios al micelio del fitopatógeno (Barak et al., 1985, Chet et al., 1998). Es más, *T. harzianum* es capaz de enrollarse sobre fibras de nailon a las que se ha adherido una lectina de *S. rolfisii* (Inbar & Chet, 1992, 1994).

Trichoderma desarrolla una serie de estructuras parecidas a un apresorio sobre el hongo al que ataca, enrollándose sobre él y destruyendo su pared celular (Elad et al., 1983). Esto último es el resultado de la acción coordinada de muchas enzimas líticas como quitinasas, glucanasas y proteasas, esencialmente (Elad et al., 1982, Haran et al., 1996a). En algunos experimentos se ha observado la inducción de estas enzimas en ausencia de contacto físico (Cortés et al., 1998, Mach et al., 1999, Zeilinger et al., 1999, Kullnig et al., 2000), lo cual puede significar que el reconocimiento es a distancia y el contacto no siempre es necesario, o bien que las enzimas estudiadas responden a un proceso de saprofitismo más que a uno más específico de micoparasitismo. En las introducciones de los dos capítulos de esta tesis se mencionan algunas de las enzimas posiblemente implicadas, cómo pueden estar regulados sus genes y a qué estímulos responden.

Aunque no existen muchos experimentos en este sentido, parece que la aparición de las actividades es un proceso secuencial, que requiere de la existencia de actividades basales previas y de un suceso de reconocimiento para la inducción de actividades más específicas del micoparasitismo (Chet et al., 1998). Así, *T. harzianum* expresa unas u otras quitinasas dependiendo de si ataca a un patógeno susceptible de ser micoparasitado, como *R. solani*, o no, como *S. rolfisii* (Haran et

al., 1996b, Inbar & Chet, 1995). Además, algunas de estas quitinasas se sintetizan secuencialmente (Haran *et al.*, 1996b).

La relevancia del papel de las enzimas en el desarrollo del micoparasitismo está en permanente discusión. Tomando como ejemplo la quitinasa CHIT42, se han obtenido todos los resultados posibles. La disrupción del gen que la codifica no provoca la disminución de la capacidad antifúngica del hongo, o no produce ningún efecto o, incluso, conduce a una mejora de dichas capacidades (Harman, 2000, Baek *et al.*, 1999, Carsolio *et al.*, 1999, Woo *et al.*, 1999). Dependiendo por tanto de qué cepas son las escogidas y en qué condiciones se realizan los experimentos, los resultados apuntarán a un papel más o menos importante de las enzimas en el micoparasitismo.

La antibiosis

Las especies del género *Trichoderma* producen gran cantidad de compuestos antibióticos, como alquil-pironas, isonitrilos, poliquétidos, peptaiboles, diketopiperacinas, sesquiterpenos y esteroides (Howell, 1998, Sivasithamparam & Guisalberti, 1998). El modo de acción debe ser muy variado, aunque sólo se tiene constancia de algunos ejemplos como la gliotoxina, que se une a grupos tiol de la membrana (Jones & Hancock, 1988), o como las trichorzianinas, que forman canales que perturban el balance iónico de la célula (Schirmböck *et al.*, 1994).

De la misma manera que ocurre para las enzimas, la importancia del papel de los antibióticos parece depender de las cepas utilizadas (Howell, 1998). Sin embargo, los resultados son complicados de interpretar por el hecho de que, al eliminar rutas de creación de antibióticos, *Trichoderma* genera vías de creación de nuevos compuestos (Harman, 2000). Por otro lado, muchos de estos antibióticos provocan efectos nocivos sobre las plantas (Bailey & Lumsden, 1998), por lo que la obtención de cepas mejores agentes de control de enfermedades modificando este mecanismo de acción puede llegar a producir el efecto contrario.

Sin embargo, uno de los aspectos más interesantes sobre el papel de los antibióticos se refiere a su acción sinérgica en unión con los enzimas (Di Pietro *et al.*, 1993, Schrimbock *et al.*, 1994, Lorito *et al.*, 1996). Este hecho se debe probablemente a que la acción de las enzimas permite una inserción más eficiente de los antibióticos sobre la membrana, provocando la muerte del patógeno más rápidamente que si actuara sólo uno de los dos mecanismos.

La competición por los nutrientes o el espacio

Trichoderma crece muy rápidamente y esporula de manera abundante, siendo capaz de utilizar una gran variedad de sustratos en muy diversas condiciones (Danielson & Davey, 1973a, b, c). Esta versatilidad es, probablemente, una de las armas más eficaces que utiliza *Trichoderma* para colonizar un medio evitando la proliferación de otros organismos (Hjeljord & Tronsmo, 1998). Sin embargo, es muy difícil de establecer si *Trichoderma* ha desplazado a otro organismo por cualquiera de los métodos más estudiados (antibióticos o enzimas, principalmente) o porque simplemente ha ocupado el espacio previamente (Harman, 2000).

La solubilización y secuestro de nutrientes inorgánicos

Las plantas dependen de ciertos nutrientes que a veces se encuentran en el medio en formas insolubles y, por tanto, no son asimilables. Éste es el caso del manganeso, soluble sólo como Mn^{2+} . De igual manera, las plantas sólo pueden tomar hierro como Fe^{2+} . Este fenómeno es muy utilizado por los patógenos, que oxidan los metales hasta formas insolubles o bien utilizan sideróforos que quelan los metales evitando que las plantas puedan asimilarlos (Chrispeels & Sadava, 1994).

T. harzianum T22 es capaz de solubilizar metales como el zinc, el manganeso, el hierro o el cobre (Altomare *et al.*, 1999). No se conoce bien la naturaleza de las moléculas que se encargan de esta acción, si bien parece claro que no se debe a la acidificación del medio producida por el crecimiento del hongo.

La resistencia inducida en plantas

Trichoderma posee enzimas que no sólo son capaces de digerir polímeros de pared de hongos, sino que también tiene xilanasas y celulasas, que degradan los principales componentes de la pared de las plantas. Estas enzimas, al igual que aquéllas de los patógenos, son capaces de inducir síntesis de etileno en plantas (Dean *et al.*, 1989, Bailey & Lumsden, 1998). La producción del etileno es una respuesta temprana de los vegetales al ataque por organismos patógenos. La inducción de esta respuesta sistémica se ha obtenido no sólo con enzimas aislados, sino utilizando el organismo completo, como ocurre con *T. harzianum* T39, que induce dicha respuesta en varias plantas susceptibles de ser atacadas por *Botrytis cinerea* (De Meyer *et al.*, 1998).

La competencia por la rizosfera parece ligada a este tipo de actividades enzimáticas. Aunque *Trichoderma* no es un buen colonizador de la rizosfera (Papavizas, 1985) se han obtenido cepas con una mayor capacidad de colonización (Ahmad & Baker, 1987, Sivan & Harman, 1991). Algunas de estas cepas poseen mayor actividad celulasa que correlaciona con su competencia colonizadora (Ahmad & Baker, 1987). Esto puede interpretarse como una relación entre organismos: la planta provee a *Trichoderma* de nutrientes exudados y el hongo la protege de infecciones más graves induciendo la respuesta sistémica en ella. Algunas de estas cepas o sus derivadas son capaces de provocar un aumento del crecimiento en las plantas (Björkman *et al.*, 1998).

Trichoderma, además de las xilanasas y las celulasas, produce muchas enzimas similares a los que las plantas utilizan para combatir a los patógenos, como proteasas, quitinasas, β -1,3-glucanasas y lipasas. La acción de estas enzimas sobre sus dianas provoca la liberación de compuestos que se han descrito como inductores de esa respuesta sistémica. Sin embargo, aún no sabemos si estos compuestos liberados exógenamente inducen en la planta la síntesis de los mecanismos de defensa.

La inactivación de los enzimas del patógeno

Trichoderma no sólo es capaz de atacar a patógenos e inducir a las plantas a defenderse, sino que también actúa contra los mecanismos que utilizan los organismos patógenos que atacan a las plantas. *T. harzianum* T39 secreta una proteasa que degrada las enzimas de *B. cinerea* encargadas de degradar la pared celular de la planta (Elad & Kapat, 1999). El hecho de que esta enzima se secrete sin la presencia de quitinasas y glucanasas parece indicar que dicha proteasa no está implicada en micoparasitismo y que su función puede ser exclusivamente la inactivación de los mecanismos de ataque del patógeno (Harman, 2000).

Trichoderma, y especialmente *T. harzianum*, es por tanto un organismo especialmente indicado no sólo para el control de enfermedades de plantas, sino que su utilización como promotor del crecimiento provee a las plantas de nutrientes, además de aumentar sus mecanismos de defensa (Harman, 2000). Después de repasar todos estos mecanismos resulta evidente que la manipulación de un solo gen puede dar lugar a cepas mejores agentes de control biológico, aumentando su potencial lítico o incorporándoles resistencias a sustancias tóxicas. Por otro lado, puede ser una herramienta que nos permita conocer más elementos sobre cómo se producen todos los fenómenos antes mencionados. De todas maneras, existen más menciones en la literatura científica sobre el uso de *Trichoderma* que sobre experimentos tendentes a comprender todos estos procesos. Y sólo cuando sepamos cómo están regulados y cómo se llevan a cabo podremos desarrollar nuevas cepas que controlen más eficientemente las enfermedades que producen los hongos sobre las plantas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Dada la importancia de las hidrolasas de paredes celulares en el antagonismo, en este trabajo se estableció como primer objetivo:

1. Obtención de cepas de *T. harzianum* mejoradas en su capacidad antagonista por sobreexpresión del gen *bgn16.2*, que codifica una β -1,6-glucanasa. Optimación de las condiciones de cultivo (pH y ausencia de proteasas extracelulares) para la producción de la proteína BGN16.2.

Por otra parte, para estimar el efecto del pH sobre la regulación génica de *T. harzianum* se estableció como segundo objetivo:

2. Aislamiento y caracterización de genes regulables por pH.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados

1.1. Hongos filamentosos

Trichoderma harzianum CECT¹ 2413

T. harzianum IMI² 206040

Trichoderma reesei CECT 2414 (=QM9414)

Trichoderma koningii CECT 2412

Trichoderma longibrachiatum CECT 2607

Trichoderma viride CECT 2423

Hypocrea jecorina BG404³

Rhizoctonia solani CECT 2815

1.2. Levaduras

Saccharomyces cerevisiae EBY VW.4000 (*Mat* α *leu2-3,112 ura3-53 trp1-289 his3- Δ 1 MAL2-8^c SUC2 Δ hxt1-17 Δ hxt8-16::loxP Δ hxt514::loxP Δ gal2 Δ stil1::loxP Δ agt1::loxP Δ mph2 Δ mph3 Δ yd1247w::loxP Δ yjr160c::loxP* (Wieczorke et al., 1999)

S. cerevisiae RE700A (*Mat* α *ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL2 SUC2 GAL MEL Δ hxt1-7* (Reifenberger et al., 1997)

1.3. Bacterias

Escherichia coli DH5 α (Amersham Pharmacia Biotech ®): F80d *lac Z* Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsd R17* (r_k^- , m_k^-), *sup E44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lac ZYA-argF*), U169

E. coli LE392 (Promega®): F^h*hsd 574*, (r_k^- , m_k^-), *supE44*, *sup F58*, *lacY1*, *galk2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*

E. coli SOLR (Stratagene®): $e14^-(mcrA)$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *umuC::Tn5(kan^r)*, *uvrC*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi1*, *endA1*, λ^R [F⁺ *proAB*, *lacI^a* Z Δ M15] Su⁻

E. coli XL1-Blue MRF⁺ (Stratagene®): $\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [F⁺ *proAB*, *lacI^a* Z Δ M15, Tn10 (*tet^r*)]

2. Vectores

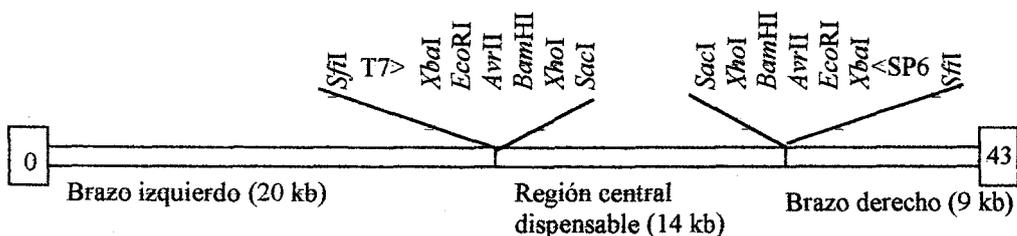
2.1. Vectores derivados del bacteriófago lambda

¹ CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia

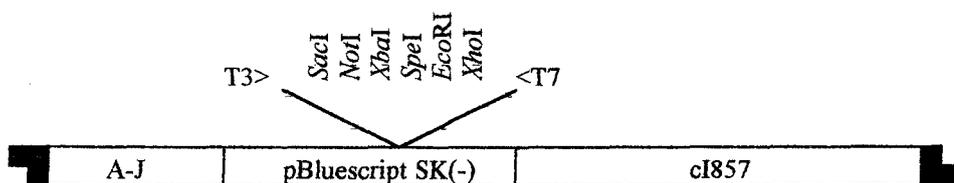
² IMI: Imperial Mycological Institute, Londres.

³ C. P. Kubicek. Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie. TU Wien. Austria

Lambda-GEM[®]-11 (Stratagene): Vector en el que se encuentra la genoteca de ADN genómico de *T. harzianum* (Lora *et al.*, 1995). Los brazos de Lambda-GEM[®]-11 derivan del fago EMBL3.



Lambda ZAP[®] II (Stratagene): Vector en el que se encuentra la genoteca de ADNc. El ARN se extrajo de micelio creciendo en condiciones de hambre de glucosa, entre otras.



2.2. Vectores plasmídicos

pBluescript[®] II SK (+) (Stratagene): abreviadamente pSK₊, se utilizó para la obtención de clonaciones intermedias para otras construcciones. El gen *lacZ* permite una sencilla selección de clones al estar situado en el sitio múltiple de clonación de manera que la clonación impide la formación de galactosidasa.

pGEM-T-easy[®] (Promega): Se empleó para la clonación de productos de PCR que tuvieran residuos de adenina terminales.

pLMRS3 (Mach *et al.*, 1994): Se empleó como vector de expresión en *T. harzianum*. Tiene un sitio de clonación con dianas para tres enzimas (*XbaI-SalI-NsiI*) entre el promotor del gen de la piruvato quinasa y el terminador de la celobiohidrolasa 2 de *T. reesei*. Procede de pUC19.

pHAT α (Herrera-Estrella *et al.*, 1990): Se empleó como vector en las transformaciones de *T. harzianum* que requirieron el uso de la higromicina como marcador. Proviene de pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987), y posee una inserción en *HindIII* de 2,4 kb de una amilasa de *T. Harzianum* (Fig. 29, Cap. 1)

p3SR2 (Kelly & Hynes, 1985): Se utilizó como vector en las transformaciones en las que el gen *amdS* era utilizado como marcador. Confiere la capacidad de crecer utilizando acetamida como fuente de nitrógeno (Fig. 1, Cap. 1).

pSK::*bgn16.2*: El fragmento *EcoRI-NotI* del ADN del fago p λ 16-1 (Lora *et al.*, 1995) se romiza y se subclona en pSK cortado con *SmaI*. La orientación es M13 en 5' y reverse primer en 3'.

pLMRS3::*bgn16.2*: Partiendo de pSK::*bgn16.2* con orientación reverse primer en 5' y M13 en 3' se corta con *XhoI*, se romiza y se corta con *XbaI*. Se clona en pLMRS3 cortado con *SalI*, romizado y cortado con *XbaI* (Fig. 1, Cap. 1).

pSK::*papA*: El fragmento de 5 kb obtenido cortando con *SalI-PstI* el ADN del fago λ 7-6 (de la genoteca genómica realizada en λ gt11 (Lora *et al.*, 1995)), se clona en pSK cortado con *SalI-PstI*.

pLMRS3::*papA*: Se amplifica la ORF del gen *papA* utilizando como ADN molde pSK::*papA* y los oligos 5'-CCTTCAAGACAACCAGTCTAGACT-3' y 5'-TCATCCCTTCAAATGTCGACCTTC-3'. Se introducen las mutaciones que están subrayadas para obtener sitios de corte *XbaI* y *SalI*. Se lleva a cabo la reacción de PCR (35 ciclos con 30 s 94°C, 30 s a 55°C y 90s a 72°C) utilizando la polimerasa Expand High Fidelity (Roche). A continuación se corta el ADN con las dianas *XbaI* y *SalI* y se clona el fragmento en pLMRS3 cortado con las mismas dianas (Fig 29, Cap. 1).

pSK::*ppt1*: Escisión del fago λ ZAP11-3, que hibridaba con el fragmento G2-2b obtenido a partir del differential display. Tiene un inserto de 1.9 kb en *EcoRI-XhoI*.

pAJ401.7: Derivado del pUC8 con el gen *ura3*, el promotor y el terminador del gen de la fosfoglicerato kinasa de *S. cerevisiae* y un inserto de 1 kb en *EcoRI-XhoI* que facilita el corte con esas enzimas de restricción al separarlas.

pAJ401::p*pt1*: El fragmento de 1,9 kb liberado con *EcoRI* y parcial de *XhoI* se clona en pAJ401.7 cortado con las mismas enzimas.

pSK::p*ao1*: Escisión del fago λZAP11-3, que hibridaba con el fragmento G2-2 obtenido a partir del differential display. Tiene un inserto de 1.8 kb en *EcoRI-XhoI*.

3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

3.1. Medio de cultivo de bacterias

Medio Luria-Bertani (LB): 5 g/l de extracto de levaduras; 10 g/l de bacto-triptona y 10 g/l de NaCl. Para medios sólidos añadir 18 g/l de agar. Para la selección de bacterias portadoras de resistencias añadir al medio:

- ampicilina sódica 100 mg/l (a partir de una solución a 100 mg/ml en agua destilada almacenada a -20°C)
- tetraciclina 12,5 mg/l (a partir de una solución a 5 mg/ml, disuelta primero en la mitad del volumen de agua, a la que añadir la otra mitad del volumen de etanol 96 %, almacenado a -20°C)
- kanamicina 50 mg/l (a partir de una solución a 20 mg/ml en agua destilada almacenado a -20°C)

Para la visualización de actividad β -galactosidasa se añadía al medio:

- Xgal 50 mg/l (a partir de una solución a 25 mg/ml en dimetilformamida, mantenida a -20°C en oscuridad)
- IPTG 25 μM (a partir de una solución 0,1M $-0,023$ g/ml- en agua destilada mantenida a -20°C).

Tanto los antibióticos como el resto de los requerimientos añadir después de autoclavar y habiendo enfriado el medio hasta 50°C .

3.2. Medios de cultivo para levaduras

Medio nutritivo YPD: 20 g/l de glucosa; 10 g/l de extracto de levadura y 20 g/l de bacto-peptona.

Medio nutritivo YPMal: 10 g/l de extracto de levadura y 20 g/l de bacto-peptona. Se autoclava y después añadir maltosa hasta una concentración final de 2% (p/v) a partir de una solución concentrada al 20% (p/v).

Medio mínimo SD: 20 g/l de glucosa; 5 g/l de sulfato amónico y 1,7 g/l de bases nitrogenadas YNB sin sulfato amónico ni aminoácidos (Difco). De igual manera se preparan SRaf (con rafinosa a 20 g/l), SAra (con arabinosa a 20 g/l), SFrc (con

fructosa a 20 g/l, SXil (con xilosa a 20 g/l) en lugar de glucosa. Cuando las fuentes de carbono añadir a 2 g/l se indica como SD0,2, SRaf0,2, etc.

Medio mínimo SMal: 5g/l de sulfato amónico y 1,7 g/l de bases nitrogenadas YNB sin sulfato amónico ni aminoácidos (Difco). Se autoclava y después añadir maltosa hasta una concentración final de 20 g/l a partir de una solución concentrada al 200 g/l. De la misma manera preparar el medio SGal.

Medio mínimo DO-S: Es un medio mínimo como SD o SMal pero añadir 2 g/l de una mezcla DO (de "Drop Out").

Todos los medios sólidos se preparan añadiendo 18 g/l de agar.

Mezcla DO ("Drop Out"): 2,0 g de alanina, 2 g de arginina, 2 g de asparragina, 2 g de ácido aspártico, 2 g de cisteína, 2 g de glutamina, 2 g de ácido glutámico, 2 g de glicina, 2 g de inositol, 2 g de isoleucina, 2 g de metionina, 0,2 g de ácido *p*-aminobenzoico; 2 g de fenilalanina, 2 g de prolina, 2 g de serina, 2 g de treonina y 2 g de valina. Agitar bien. De esta mezcla están ausentes la adenina, el uracilo, la leucina, el triptófano, la histidina y la lisina, que por utilizarse comúnmente como marcadores se añaden si son necesarios.

Requerimientos: Preparar soluciones concentradas como se describe más adelante en agua destilada y autoclavar. Añadir la cantidad indicada antes o después de autoclavar:

- Adenina: 2 g/l. Añadir 10 ml/l. Guardar a 4°C.
- Uracilo: 2 g/l. Añadir 10 ml/l. Guardar a temperatura ambiente.
- Histidina: 10 g/l. Añadir 2 ml/l. Guardar a 4°C.
- Leucina: 20 g/l. Añadir 3 ml/l. Guardar a temperatura ambiente.
- Lisina: 10 g/l. Añadir 3 ml/l. Guardar a 4°C.
- Triptófano: 10 g/l. Añadir 2 ml/l. Guardar a 4°C.

3.3. Medios de cultivo de hongos filamentosos

Medio Mínimo (MM): KH_2PO_4 15 g/l y metales traza 1 mg/l ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,6 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4 g/l y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g/l). El pH se ajustaba a 5,5 con KOH 10N. Una vez autoclavado y enfriado hasta 50°C, añadir MgSO_4 0,6 g/l y CaCl_2 0,6 g/l.

Como fuentes de carbono utilizar: glucosa 20 g/l o bien 0,1 o 0,2 g/l, quitina en escamas 15 g/l, pustulan 7,5 g/l, glicerol 20 g/l, arabinosa 20 g/l, xilosa 20 g/l, citrato 20 g/l o lactosa 20 g/l.

Como fuentes de nitrógeno utilizar: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l (añadir después de autoclavar), extracto de levadura 10 g/l, peptona 10 g/l, caseína 10 g/l, prolina 5,2 g/l, urea 5 g/l, glutamina 4,3 g/l (30 mM), leucina a 0,6 g/l (5 mM) o 3 g/l (30 mM), fenilalanina a 0,8 g/l (5 mM) o D-metionina 0,74 g/l (5 mM).

Cuando se tampona el medio de cultivo utilizar: tampón citrato sódico 0,2 M a pH 2,7, que añadido al medio mínimo da un pH de 3; tampón MES-KOH 0,2 M a pH 6 y tampón Tris-HCl 0,2 M a pH 8.

Medio nutritivo PPG: 20 g/l puré de patatas (Maggi), 20 g/l de glucosa y 20 g/l agar. Se utiliza para la obtención de esporas y mantenimiento de estirpes.

Medios nutritivos PDB y PDA: El medio PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) se prepara añadiendo 24 g/l del preparado comercial. El medio PDA (Potato Dextrose Agar) se prepara añadiendo 15 g/l de agar a un medio PDA. La higromicina, cuando es necesario, añadir a 75 mg/l a partir de una solución concentrada a 100 mg/ml preparada en agua destilada y guardada a 4°C.

Cuando se requiere la formación de colonias, añadir tritón X-100 a los medios hasta una concentración de 0,1% (v/v) a partir de una solución concentrada al 20 % (v/v) y mantenida a 4°C. Añadir después de autoclavar, cuando el medio se ha enfriado a 50°C.

3.3.1. Recogida de esporas y mantenimiento

A una caja de *Trichoderma* crecida durante el tiempo suficiente para que la superficie del micelio esté cubierta de esporas (7-10 días para *T. harzianum* CECT 2413 cultivado a 22°C con luz continua), añadir 10 ml de agua destilada. Rascando la superficie se despega lo que queda del micelio y las esporas. A continuación se filtra la suspensión por un papel de filtro. Seguidamente se lava una vez con 5 ml de agua destilada, centrifugando a 150 g. Este proceso da una suspensión de $3\text{-}5 \cdot 10^8$ esporas/ml. Las esporas pueden ser almacenadas a 4°C hasta su uso.

3.3.2. Condiciones de cultivo básicas

3.3.2.1. Para extraer ADN

Se inocula un matraz con PDB con esporas hasta una concentración final de 10^6 esporas/ml. Se cultiva el matraz a 22°C durante 48 h, o a 30°C durante 36 h. En ambos casos se usa un agitador a 250 rpm.

3.3.2.2. Para experimentos de inducción enzimática y regulación génica.

Inocular un matraz con medio mínimo (MM) con glucosa 2 % (p/v) y sulfato amónico 0,5 % (p/v) con esporas hasta una concentración final de 10^6 esporas/ml. Cultivar durante 40 h a 22°C y 250 rpm, condiciones establecidas para llegar a fase exponencial media. A continuación, recoger el micelio por filtración en un kitasato a través de papel de filtro o de Miracloth® (Calbiochem) y se lava con medio volumen de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (42,7 g/l, 0,2M) y agua destilada. Una vez lavados, transferir los micelios a los medios de cultivo de donde se quiere obtener

proteína o ARN, y se cultivan durante 24 h en las mismas condiciones de agitación y temperatura.

En los experimentos realizados para obtener el ARN utilizado en el Differential Display, así como en aquellos relacionados con los genes obtenidos a partir de él, los tiempos se modifican de manera que el segundo cultivo se incubaba sólo durante 8 h.

4. Mantenimiento de microorganismos

Bacterias: Para el mantenimiento a corto plazo (1 mes), las cepas se conservan a 4°C crecidas en cajas de LB, selladas con Parafilm®. Cuando se quieren guardar durante más tiempo se preparan suspensiones de células en 15% (v/v) glicerol y se almacenan a -80°C.

Levaduras: Para el mantenimiento a corto plazo (1 mes), las cepas se conservan a 4°C crecidas en cajas selladas con Parafilm®. A largo plazo, se utiliza una suspensión de células en glicerol al 20% (v/v) que se almacena a -80°C.

Hongos filamentosos: Para el mantenimiento a corto plazo (6 meses) se crecen en PDA en tubos de agar inclinado y se conservan a 4°C. A largo plazo, se utiliza una suspensión de esporas en glicerol al 20% (v/v) que se almacena a -80°C.

Bacteriófagos: A corto plazo, los fagos se mantienen a 4°C en tampón SM autoclavado. Al añadir la calva recortada de agar o la solución de fagos, añadir cloroformo hasta 0,1% (v/v) y se agita para matar las células bacterianas que quedan. Para el mantenimiento a largo plazo se guardan a -80°C, utilizando tampón SM con dimetilsulfóxido (DMSO) al 7% (v/v).

Tampón SM: gelatina al 0,01% (p/v), MgSO₄ 10 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

5. Escrutinio de genotecas del fago λ-GEM®11

5.1. Preparación de *E. coli* LE392 para transducción

1. La estirpe de *E. coli* LE392 se cultiva en 3 ml de LB durante una noche a 37°C.
2. Al día siguiente, añadir 1 ml de este cultivo a 50 ml de LB (suplementado con MgSO₄ 10 mM y maltosa al 0,2% (p/v)).
3. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD₆₀₀) de 0,3-0,4, las células se centrifugan durante 10 min a 4000 rpm y se lavan con 25 ml de MgSO₄ 10 mM frío.
4. El precipitado se resuspende en 500 µl de MgSO₄ 10 mM frío. Las células se pueden guardar así durante una semana.

5.2. Infección de células con el bacteriófago lambda

1. Se mezclan 40 µl de la suspensión de células (lo más frescas posibles) con un volumen de fagos convenientemente diluidos en SM. La dilución depende de si queremos calvas confluyentes o calvas bien aisladas unas de otras. Esta mezcla se incuba 30 min a 37°C.
2. La mezcla añadir a tubos con 3 ó 7 ml de LB (dependiendo de si se utilizan cajas de Petri de 10 cm o de 15 cm de diámetro) con 7 g/l de agar precalentados a 42°C. Se mezcla todo por inversión y se vierte sobre cajas de Petri con LB.
3. Las cajas se incuban a 37°C hasta que aparecen las calvas, normalmente durante 10-12 h.

5.3. Aislamiento de calvas de bacteriófago en medio sólido

1. Con la boca de una pipeta Pasteur o con una punta de pipeta de 1 ml recortada se aísla el fragmento de agar que contiene la calva de interés.
2. Se introduce el fragmento de agar en un tubo de 1,5 ml con 500 µl de tampón SM. Añadir 10 µl de cloroformo y se agita vigorosamente para eliminar las células bacterianas. Se guarda a 4°C.

5.4. Amplificación de bacteriófago en medio sólido

1. Una vez que se ha seleccionado una calva de bacteriófago y se quiere amplificar para obtener una suspensión concentrada para guardar o para extraer el ADN es necesario primero realizar una lisis como se ha descrito en el apartado 5.2. Para ello, se tomará una concentración de fagos tal que permita la obtención de calvas confluyentes. Además se utilizaran cajas de 15 cm de diámetro con LB e inoculadas con 7 ml de agar de cobertera.
2. A las cajas, una vez que han crecido las bacterias y los fagos y se visualizan bien las calvas confluyentes, añadir 10 ml de tampón SM, y se mantienen con agitación a 4°C durante unas 4 horas.
3. A continuación se recoge el tampón, al que han difundido los fagos, y se rasca la agarosa de cobertera sin coger agar. Se pasa todo a un tubo de centrifuga de 40 ml. Una vez bien fragmentado la agarosa añadir cloroformo hasta el 2% (v/v), se mezcla bien y se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 min.
4. Añadir al sobrenadante cloroformo hasta 0,1 % (v/v). Mezclar bien y guardar a 4°C. Es conveniente hacer lisis con diluciones seriadas a fin de titular el caldo de fagos.

Nota Si se quiere extraer ADN, sustituir el agar de cobertera por agarosa. De esta manera, se eliminan impurezas que dificultan después la manipulación del ADN.

6. Escrutinio de genotecas en el fago λ-ZAP®-II

La obtención del caldo de fagos se realiza como en el apartado 5. El sistema λ -ZAP[®]-II (Stratagene) permite una eficiente escisión del fagémido pBluescript a partir del vector viral. El fago ayudante M13 ExAssist[®] contiene una mutación ámbar que evita la replicación del genoma del fago en una cepa no supresora de *E. coli* como SOLR. Esto permite la replicación sólo del fagémido escindido en el hospedador, eliminando la posibilidad de una co-infección del fago ayudante. Para este proceso es necesario el uso de *E. coli* XL1-Blue MRF', ya que el episoma F' contiene funciones indispensables para la escisión.

El fago ayudante se encarga de sintetizar ADN de una cadena a partir de los iniciadores del fago λ . Esta molécula es circularizada por el producto del gen II del fago M13 ayudante, formando una cadena circular que contiene todo lo que hay entre el iniciador y el terminador: secuencia del fagémido pBluescript y el inserto que hemos clonado. Las señales de empaquetamiento están también incluidas, de manera que el fagémido en forma de ADN circularizado de una cadena es secretado. A continuación, las células de *E. coli* se eliminan calentando a 70°C. Este ADN se puede secuenciar, subclonar, etc. En este caso, se introduce el fagémido en SOLR. El fago ayudante no crecerá, ya que no se puede replicar en la cepa no supresora SOLR y no contiene genes de resistencia a ampicilina. Además la cepa SOLR es resistente a la infección con el fago λ , evitando contaminaciones con el fago después de la escisión. Así, sólo crecerán las células de SOLR que hayan incorporado y replicado convenientemente el fagémido.

Se pueden realizar escisiones en masa para hacer librerías de sustracción o sondas de ADN para sustracción.

6.1. Escisión *in vivo* mediante el sistema ExAssist/SOLR

1. Inocular *E. coli* XL1-Blue MRF' y SOLR en LB a 30°C durante una noche.
2. Inocular 500 μ l del cultivo en 50 ml de LB. Cultivar a 37°C durante 2-3 h hasta que la OD₆₀₀ sea 0,2-0,5.
3. Centrifugar el cultivo de XL1-Blue MRF' a 1500 g. Resuspender hasta OD₆₀₀=1,0 para la escisión de un solo clon y a OD₆₀₀=5 en MgSO₄ 10 mM para una escisión en masa.
4. Dejar crecer las células de SOLR hasta una OD₆₀₀=0,5-1. Una vez que han alcanzado ese punto. Dejarlas a temperatura ambiente.
5. En un tubo de 50 ml mezclar: 200 μ l de XL1-Blue MRF' a OD₆₀₀=1; 250 μ l del caldo de fagos (conteniendo más de $1 \cdot 10^5$ ufc) y 1 μ l de fago ayudante ExAssist[®] (conteniendo más de $1 \cdot 10^6$ ufc/ml). Si se escinde una librería entera, conviene utilizar diez o cien veces más del fago λ a escindir, corrigiendo los volúmenes de manera que las proporciones sean 100:10:1 (Fago ayudante:XL1-Blue MRF': fago λ).
6. Incubar la mezcla a 37°C durante 15 min.

7. Añadir 3 ml de LB (25 ml para una escisión en masa) e incubar 2-2,5 h a 37°C con agitación.
8. Centrifugar a 2000 g durante 15 min. Transferir el sobrenadante a un tubo y calentarlo a 70°C durante 15 min.
9. Centrifugar a 2000 g durante 15 min.
10. El sobrenadante contiene el fagémido pBluescript empaquetado como partículas de fago filamentosos, y puede ser almacenado a 4°C durante 1-2 meses.
11. Para inocular los fagémidos; añadir 200 µl de las células SOLR a una OD₆₀₀=1 a dos tubos de 1,5 ml. Añadir 100 µl del sobrenadante del paso 10 (1 µl si es una escisión en masa) a un tubo y 10 µl a otro tubo.
12. Incubar a 37°C durante 15 min.
13. Inocular 10-50 µl de cada tubo en cajas de LB con ampicilina (50 µg/ml) e incubar 12 h a 37°C.

Las colonias que aparecen tienen el fagémido pBluescript en doble cadena con el ADN clonado inserto.

Notas: *E. coli* XL1-Blue MRF' se mantiene en LB con tetraciclina, y *E. coli* SOLR en LB con kanamicina.

7. Transformación de microorganismos

7.1. Transformación de *E. coli*

7.1.1. Método del CaCl₂

7.1.1.1. Preparación de células competentes

1. Inocular una colonia de *E. coli* en 3 ml de LB. Incubar durante 9-10 h a 37°C.
2. Añadir 500 µl del inóculo a 200 ml de medio SOB. Incubar a 22°C hasta que la densidad óptica a 600 nm sea de 0,42-0,7 (tarda unas 20 horas).
3. Enfriar en hielo las células durante 20 min en tubos de centrifuga de 250 ml.
4. Centrifugar a 2500 g durante 10 min a 4°C.
5. Resuspender en 20 ml de solución TB fría. Añadir entonces 60 ml de TB frío. Mantener 10 min en hielo.
6. Centrifugar a 2500 g durante 10 min a 4°C.
7. Resuspender en 20 ml de TB frío. Añadir lentamente 1,5 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) y alicuotar las células en tubos de 1,5 ml preenfriados a -80°C y congelarlas inmediatamente en nitrógeno líquido.

7.1.1.2. Transformación

1. Añadir el vector o la mezcla de ligación, tratando de que el volumen que añadir no sea superior al 10% del volumen de células competentes.
2. Incubar en hielo durante 30 min.

3. Incubar a 42°C durante 60 s.
4. Pasar inmediatamente a hielo y mantener 5 min.
5. Añadir 800 µl de LB e incubar 30 min a 37°C.
6. Sembrar en medio apropiado.

Medio SOB: triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl a 0,5 g/l, añadir 5 ml/l de una solución de KCl a 250 mM. Se ajusta el pH a 7 con NaOH y se autoclava. Finalmente, añadir 5 ml/l de MgCl₂ 2M.

Solución TB: pipes (ácida) 3,02 g/l, CaCl₂·H₂O 2,2 g/l, KCl 18,6 g/l. Ajustar el pH a 6,7 con KOH 2N. Añadir MnCl₂·4H₂O 10,88 g/l. Esterilizar por filtración.

7.1.2. Método de TSS

7.1.2.1. Preparación de células competentes

1. Inocular 3 ml de LB con una colonia de bacterias y se incuban a 37°C toda la noche.
2. Inocular 30 ml de LB con 300 µl del cultivo. Incubar a 37°C hasta que la OD₆₀₀ sea de 0,35-0,6.
3. Repartir alícuotas de 1 ml y enfriar en hielo durante 5 min.
4. Centrifugar las células para decantar y resuspenderlas en 75 µl de LB frío. Mantener 5 min en hielo.
5. Añadir 75 µl de TSS 2x. Mezclar bien y mantener 5 min en hielo. Se pueden usar inmediatamente o congelar en el momento con nitrógeno líquido.

7.1.2.2. Transformación

1. Descongelar las células en hielo.
2. Añadir el ADN transformante y mantener en hielo durante 30 min.
3. Incubar 40 s a 42°C.
4. Pasar rápidamente a hielo. Mantener en hielo durante 5 min.
5. Añadir 1 ml de LB e incubar durante 90 min a 37°C.
6. Sembrar en medio apropiado.

Solución TSS 2x: triptona 8 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, PEG8000 200 g/l, DMSO 10% (v/v). Añadir 100 ml/l de una solución MgSO₄ 1M. Añadir unos 700 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6,5. Añadir agua hasta 1 l.

7.1.3. Método de electroporación

7.1.3.1. Preparación de células competentes

1. Inocular una colonia de *E. coli* en 20 ml de SOB (sin Mg). Incubar a 37°C toda la noche.
2. Añadir 5 ml del cultivo a 500 ml de SOB (sin Mg). Incubar a 37°C hasta que la OD₆₀₀ sea de 0,8.

3. Pasar el cultivo a 4 tubos de centrifuga de 250 ml preenfriados. Centrifugar durante 5 min a 5500 g a 4°C.
4. Resuspender en dos tubos de centrifuga de 250 ml con 200 ml de glicerol al 10% (p/v) cada uno. Centrifugar durante 7 min a 5500 g a 4°C.
5. Repetir la operación. Centrifugar durante 15 min a 5500 g a 4°C.
6. Resuspender en dos tubos con 50 ml de glicerol estéril al 10% (p/v). Centrifugar 10 min a 5500 g a 4°C.
7. Resuspender en 6-8 ml de glicerol estéril al 10% (p/v).
8. Repartir en tubos de 1,5 ml preenfriados añadiendo 200 µl a cada uno.
9. Congelar rápidamente en nitrógeno líquido y mantener a -80°C.

7.1.3.2. Transformación

1. Descongelar las células en hielo durante 30 min.
2. Poner en hielo un tubo eppendorf y una cubeta de electroporación.
3. Añadir 40 µl de células y 1 µl de ADN transformante (en agua, preferentemente) a los tubos eppendorf. Mantener 5 min en hielo.
4. Pasar la mezcla a una cubeta de electroporación, asegurándose de que las células estén en el fondo. Mantener en hielo 5 min.
5. Preparar tubos con 1 ml de LB o cualquier otro medio nutritivo.
6. Encender el electroporador. Seleccionar un voltaje de 2,5 KV (200 ohmios, 25 µFD). En el selector de tiempo, éste debe estar entre 4,7-5 ms.
7. Tomar la cubeta de electroporación. Limpiar las láminas metálicas. Colocarlas en el soporte hasta el fondo. Descargar la corriente.
8. Añadir rápidamente el mililitro de LB, recogiendo las células y devolviéndolo el mililitro con las células al tubo. Incubar 45-60 min a 37°C.
9. Sembrar en medio apropiado.

7.2. Transformación de levaduras

Se realizó siguiendo el método de Ito *et al.*, (1983) con las modificaciones de Schiestl & Gietz (1989).

1. Inocular en medio nutritivo YPD o YPMal (para las estirpes defectivas en la asimilación de glucosa) hasta que la OD₆₆₀ sea de 0,2-0,6.
2. Tomar 5 ml para cada transformación que se vaya a realizar.
3. Lavar con agua destilada.
4. Lavar con la Solución TE-acetato de litio y resuspender cada 5 ml en 50 µl de TE-acetato de litio.
5. Mezclar: 50 µl de células, 5 µl de ADN de esperma de salmón y 0,1-1 µg de ADN transformante.
6. Añadir 300 µl de Solución PEG-TE-acetato de litio fresca.
7. Incubar a 30°C durante 30 min.
8. Mantener a 42°C durante 15 min. Pasar inmediatamente a hielo.

9. Centrifugar a 4500 g durante 1 min.
10. Lavar con agua destilada dos veces.
11. Inocular en el medio selectivo adecuado.

Solución TE 10x: EDTA 10 mM en Tris-HCl 0,1 M a pH 7,5.

Solución Acetato de Litio 10x: acetato de litio 1 M. Ajustar el pH a 7,5 con acético glacial diluido. Filtrar para esterilizar.

Solución TE-acetato de litio: acetato de litio 0,1 M en TE 1x.

Solución PEG-TE-acetato de litio: PEG4000 al 40 % (p/v), acetato de litio 0,1 M en tampón TE 1x.

Esperma de Salmón: Disolver el ADN de esperma de salmón tipo III (D1626, Sigma) en TE a pH 8 a 10 mg/ml. Dejar a 4°C durante toda la noche. Sonicar durante 10 s a 100 W, lo que resulta en un tamaño medio de 7 kb -entre 15 y 2 kb-. Añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar y centrifugar 10 min a 10000 rpm. Tomar el sobrenadante y repetir con cloroformo. Centrifugar 30 min a 10000 rpm. Añadir al sobrenadante acetato sódico hasta 0,3 M y 2,5 volúmenes de etanol 96 %. Mantener 30 min a -20°C. Centrifugar 10 min a 10000 rpm. Lavar el precipitado con etanol 70%. Centrifugar 10 min a 10000 rpm. Resuspender el precipitado en TE hasta 10 mg/ml. Calentar durante 20 min a 100°C y enfriar rápidamente en hielo. Congelar en alícuotas a -20°C. Si se utiliza ADN de arenque no es necesario fragmentarlo sonicando. El ADN también se puede fragmentar haciéndolo pasar 10 veces por una aguja hipodérmica de calibre inferior a 0,9 mm.

7.3. Transformación de *T. harzianum*

7.3.1. Transformación usando el gen *amdS* como marcador

La transformación de *T. harzianum* usando el gen *amdS* como marcador se lleva a cabo mediante el protocolo desarrollado por Penttilä *et al.*, (1987).

1. Preparar cajas de PPG cubiertas con celofanes, previamente humedecidos en agua caliente y autoclavados entre papeles de filtro empapados en agua destilada.
2. Inocular *T. harzianum* en las cajas a una concentración final de $3-5 \cdot 10^6$ esporas/caja, diluidas en NaCl 0,9 % (p/v). Incubar a 30°C durante 18 h, hasta que se observe el micelio.
3. Lavar los celofanes en Solución L con 1 mg/ml de preparado de enzimas líticos hasta que se desprenda el micelio. Utilizar 15 ml de solución por cada 5 celofanes.
4. Incubar a 30°C durante 1,5-3 h agitando a 90 rpm. Observar la formación de protoplastos al microscopio. Ayudar a disgregar el micelio pipeteando o agitando con una pipeta.
5. Filtrar la suspensión de protoplastos a través de lana de vidrio. Lavar la lana con 10 ml de Solución L y mezclar con los 15 ml recogidos.
6. Añadir lentamente sobre la pared un volumen de Solución A. Centrifugar a 4000 g durante 15 min.

7. Recoger los protoplastos que se hallan en la interfase.
8. Añadir un volumen de solución B. Centrifugar a 4000 g durante 5 min.
9. Lavar el precipitado con solución B dos veces, centrifugando a 4000 g durante 5 min.
10. Resuspender en 400 μ l de Solución SCT. Contar al microscopio. Debe haber entre $5 \cdot 10^5$ y 10^8 protoplastos/ml.
11. Inocular un control de regeneración previo al tratamiento con PEG en medio no selectivo con diluciones de factor 4 a 7 preparadas en solución B. Inocular usando 7 ml de agar de cobertera.
12. Añadir 20 μ l de ADN (3-5 μ g p3SR2 y diez veces más del vector que queramos utilizar) a 200 μ l de protoplastos en un tubo de 10 ml.
13. Añadir lentamente 50 μ l de Solución PCT fresca. Mezclar bien e incubar 20 min en hielo.
14. Añadir lentamente 2 ml de Solución PCT. Mezclar por inversión. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
15. Añadir 4 ml de Solución SCT. Mezclar.
16. Inocular controles de regeneración (posteriores al tratamiento con PEG) en medio no selectivo con diluciones de factor de dilución 3 a 6, preparadas en solución B. Inocular usando 7 ml de agar de cobertera.
17. Inocular en cajas de medio selectivo alícuotas de 100 y 500 μ l, usando 7 ml de agar de cobertera.
18. Incubar 7 días a 30°C.

Solución L: Tampón fosfato sódico 10 mM pH 5,8 con $MgSO_4$ 1,2 M. Ajustar el pH final cuando se ha añadido el $MgSO_4$.

Solución A: Sorbitol 0,6 M en tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 7.

Solución B: Sorbitol 1,2 M en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

Solución SCT: Sorbitol 1,2 M y $CaCl_2$ 10 mM en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

Solución PCT: PEG 6000 al 25 % (p/v) y $CaCl_2$ 10 mM en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5. Esta solución debe ser preparada inmediatamente antes de usarla. Esterilizar por filtración.

Medio selectivo: MM como se ha descrito en el apartado 3.2.1, con 20 g/l de glucosa y 182,2 g/l de sorbitol (1 M). Para hacer las cajas, añadir 18 g/l de agar noble, y si es para el agar de cobertera, añadir 30 g/l de agar noble. Después de autoclavar, añadir, además de $MgSO_4$ y $CaCl_2$, CsCl hasta 12,5 mM y acetamida hasta 10 mM. Mantener a 50°C el medio que se va a utilizar para el agar de cobertera.

Medio selectivo con tritón: MM como el anterior, pero sin sorbitol y añadiendo tritón X-100 hasta una concentración final del 0,1 % (v/v). Este medio se utiliza para la estabilización de los transformantes, descrita en el capítulo 1 de esta tesis.

Medio no selectivo: MM como se ha descrito en el apartado 3.2.1 pero añadiendo 182,2 g/l de sorbitol (1 M). Si se va a utilizar para cajas, añadir 18 g/l de agar; y si es para hacer el agar de cobertera, añadir 30 g/l de agar.

Notas: El paso más complicado es la obtención de protoplastos. Es recomendable hacer pruebas con distintas concentraciones de los preparados líticos comerciales, usando concentraciones de 0,5 mg/ml hasta 5 mg/ml. A veces puede no observarse interfase de protoplastos, porque su número sea escaso o porque no se haya formado bien. En ese caso se puede mezclar bien por inversión el tubo que debería contener la interfase, dividirlo en dos y seguir el proceso como si eso fuera la interfase recogida. Los pasos de centrifugado se hacen siempre en un rotor basculante.

7.3.2. Transformación usando el gen *hph* como marcador

La transformación de *T. harzianum* usando el gen *hph* como marcador se lleva a cabo mediante el protocolo desarrollado por Herrera-Estrella *et al.*, (1990).

1. Preparar cajas de PPG cubiertas con celofanes, previamente humedecidos y autoclavados entre papeles de filtro empapados en agua destilada.
2. Inocular *T. harzianum* en las cajas a una concentración final de $3-5 \times 10^6$ esporas/caja, diluidas en NaCl 0,9% (p/v). Incubar a 30°C durante 18 h, hasta que se observe el micelio.
3. Lavar los celofanes en Solución A con 1 mg/ml de preparado de enzimas líticos. Utilizar 15 ml de solución por cada 5 celofanes.
4. Incubar a 30°C durante 1,5-3 h agitando a 90 rpm. Observar la formación de protoplastos al microscopio.
5. Filtrar la suspensión de protoplastos a través de lana de vidrio. Lavar la lana con 10 ml de Solución A y mezclar con los 15 ml recogidos.
6. Centrifugar a 4000 g durante 10 min.
7. Resuspender el precipitado en 1 ml de solución B.
8. Centrifugar a 4000 g durante 10 min y resuspender en 200 μ l de B. Contar al microscopio. Resuspender en un volumen de B tal que dé una concentración final de 10^8 protoplastos/ml.
9. En un tubo de 10 ml mezclar 200 μ l de protoplastos, ADN resuspendido en 10 μ l de tampón TE y 50 ml de solución PEG-CT.
10. Incubar en hielo durante 20 min.
11. Añadir 2 ml de solución PEG-CT. Mezclar bien. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
12. Añadir 4 ml de solución B y mezclar cuidadosamente.
13. Inocular en cajas de medio no selectivo con diluciones de factor de dilución 3 a 6, preparadas en solución B. Inocular usando 5 ml de agar de cobertera.
14. Inocular en cajas de medio selectivo alícuotas de 100 y 500 μ l. Inocular usando 5 ml de agar de cobertera.
15. Incubar 5 días a 30°C.

Solución A: 1,2 M de sorbitol en tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 5,6.

Solución B: 1 M sorbitol y 50 mM de CaCl₂ en tampón Tris-HCl a 10 mM a pH 7,5.

Solución PEG-CT: PEG 6000 25% (p/v) y CaCl_2 a 50 mM en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5. Esta solución debe ser preparada inmediatamente antes de usarla. Esterilizar por filtración.

Medio selectivo: PDA con y 125 mg/l de higromicina (añadida después de autoclavar desde una solución concentrada a 100 mg/ml). El agar de cobertera se prepara utilizando PDA con 8 g/l de agar, en lugar de los 15 g/l utilizados para las cajas. Además, al agar de cobertera, no se le añade antibiótico. Las cajas se hacen con 20 ml de PDA.

Medio no selectivo: PDA con 218,6 g/l de sorbitol (1,2 M). El agar de cobertera se prepara utilizando PDA con 8 g/l de agar, en lugar de los 15 g/l utilizados para las cajas.

Medio selectivo con tritón: Medio selectivo sin sorbitol y con tritón X-100 al 0,1 % (v/v).

8. Extracción de ácidos nucleicos

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

1. Inocular una colonia de *E. coli* en 1,5 ml de LB (suplementado o no con el antibiótico correspondiente). Incubar a 37°C un mínimo de 8 horas.
2. Centrifugar el cultivo a 15000 g durante 30 s.
3. Resuspender en 100 μ l de Solución 1 a 4°C.
4. Añadir 200 μ l de Solución 2. Mezclar hasta que quede transparente. Mantener en hielo.
5. Añadir 150 μ l de Solución 3 fría. Mezclar por inversión. Mantener en hielo durante 3-5 min.
6. Centrifugar a 15000 g durante 5 min.
7. Tomar el sobrenadante y añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar vigorosamente.
8. Centrifugar a 15000 g durante 5 min.
9. Recuperar la fase acuosa (superior) y añadir 2,5 volúmenes de etanol 96% a -20°C.
10. Centrifugar a 15000 g durante 10 min.
11. Descartar el etanol y añadir al precipitado 1 ml de etanol 70%.
12. Centrifugar a 15000 g durante 3 min.
13. Descartar el etanol. Dejar secar el precipitado. Resuspender en 25 μ l de tampón TER.

Solución 1: 25 mM de sacarosa, 10 mM de EDTA en tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8.

Solución 2: NaOH 0,2 N y SDS 1 %.

Solución 3: Acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 11,5 % (v/v).

Tampón TER: 1mM de EDTA en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5. Añadir ARNasa A hasta 25 μ g/ml.

Fenol: Se utiliza fenol equilibrado a pH 8 con Tris (USB). Salvo que se indique lo contrario (como "fenol ácido") siempre se utilizará fenol equilibrado.

8.2. Extracción de ADN de bacteriófagos

1. Un lisado obtenido como se describe en el apartado 5.4 se mantiene a temperatura ambiente durante 15 min.
2. Añadir ADNasa I y ARNasa A a una concentración final de 1 µg/ml. Incubar a 37°C durante 30 min.
3. Precipitar con un volumen de Solución PEG-NaCl. Incubar 1 h en hielo.
4. Centrifugar a 14500 g durante 10 min a 4°C. Descartar todo el sobrenadante, retirando los restos con pipeta.
5. Resuspender el precipitado en 1 ml de tampón SM por cada mililitro de lisado, lavando bien las paredes del tubo.
6. Añadir un volumen de cloroformo, agitar con fuerza y centrifugar a 3000 g durante 15 min.
7. Tomar la fase acuosa y añadir hasta concentración final: EDTA 20 mM a pH 8, SDS 0,5 % (p/v) y proteinasa K a 50 µg/ml. Mezclar por inversión e incubar a 56°C durante 1 h. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
8. Añadir un volumen de fenol. Mezclar por inversión.
9. Centrifugar a 12000 g durante 10 min a temperatura ambiente.
10. Tomar la fase acuosa y añadirle un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar por inversión.
11. Centrifugar a 12000 g durante 10 min a temperatura ambiente.
12. Tomar la fase acuosa y añadir un volumen de cloroformo. Mezclar con fuerza.
13. Centrifugar a 12000 g durante 15 min a temperatura ambiente.
14. Tomar la fase acuosa y añadir una décima parte del volumen de acetato sódico 3 M a pH 7. Mezclar bien y añadir dos volúmenes de etanol 96 %. Mezclar bien.
15. Incubar a -80°C durante 10-15 min.
16. Centrifugar a 7500 g durante 5 min a 4°C.
17. Añadir 3 ml etanol 70% y agitar.
18. Centrifugar a 7500 g durante 5 min a 4°C.
19. Resuspender el precipitado en tampón TE.

Solución PEG-NaCl: PEG 8000 al 20 % (p/v) y 58,5 g/l de NaCl. Filtrar a través de una membrana de 0,22 µm para esterilizar.

8.3. Extracción de ARN de levaduras

1. Inocular una colonia en 10 ml de medio e incubar a 30°C con agitación hasta que la OD₆₆₀ sea 1.
2. Centrifugar el cultivo a 1800 g durante 3 min. Lavar con 1 ml de agua destilada fría.
3. Centrifugar a 15000 g durante 20 s a 4°C.
4. Resuspender el precipitado en 400 µl de solución TES. Añadir 400 µl de fenol ácido. Agitar enérgicamente.

5. Incubar a 65°C durante 30-60 min, agitando ocasionalmente.
6. Mantener 5 min en hielo.
7. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4°C.
8. Tomar la fase acuosa y añadir 400 µl de fenol ácido. Agitar vigorosamente. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4°C.
9. Tomar la fase acuosa y añadir 400 µl de cloroformo. Agitar vigorosamente. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4°C.
10. Tomar la fase acuosa y añadir acetato sódico hasta 0,3 M y 2,5 volúmenes de etanol 96 %. Mantener 30 min a -20°C.
11. Centrifugar a 15000 g durante 10 min.
12. Lavar el precipitado con 1 ml de etanol 70 %, agitando.
13. Centrifugar a 15000 g durante 3 min.
14. Resuspender el precipitado en 50 µl de agua tratada con DEPC.

Solución TES: 5 g/l de SDS en una solución EDTA 10 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 7,5. Todos los componentes acuosos de esta solución TES, el acetato sódico que se use para precipitar el ARN y el agua usada para obtener el etanol 70 % deben tratarse con DEPC como se describe en 8.4.2.

Fenol ácido: El fenol ácido se prepara como está descrito en el apartado 8.4.3.

8.4. Extracción de ácidos nucleicos de *T. harzianum*

8.4.1. Extracción rápida de ADN genómico adecuado para PCR.

En algunas ocasiones es necesaria hacer una extracción de ADN genómico de muchos cultivos simultáneamente para, por ejemplo, realizar PCR. Para evitar el complicado proceso que se describe en 8.4.2, se puede llevar a cabo el siguiente protocolo, desarrollado por Cenis (1992):

1. Inocular en 500 µl de PDB (en un tubo de 1,5 ml) y cultivar durante 72 horas a 22-30°C.
2. Centrifugar a 15000 g durante 5 min. Lavar el micelio con tampón TE.
3. Centrifugar a 15000 g durante 5 min.
4. Añadir al micelio 300 µl de Tampón de Extracción y homogeneizar.
5. Añadir 150 µl de acetato sódico 3 M a pH 5,2. Mantener a -20°C 10 min.
6. Centrifugar a 15000 g durante 5 min. Tomar el sobrenadante y añadir un volumen de isopropanol. Mantener 5 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 15000 g durante 10 min. Lavar el precipitado con 500 µl de etanol 70 %.
8. Centrifugar a 15000 g durante 3 min. Resuspender el precipitado en 50 µl de agua desionizada.

Normalmente se obtienen entre 3 y 6 µg de ADN. Para las reacciones de PCR se puede tomar entre 1 y 3 µl.

Tampón TE: 1mM de EDTA en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

Tampón de Extracción: 0,5 % (p/v) de SDS, 0,25 M NaCl y 25 mM EDTA en Tris-HCl 0,2 M pH 8,5.

Notas: Para homogeneizar se puede pipetear o bien utilizar una varilla a la que se acopla un tubo de 500 µl en el extremo a modo de maza de un homogenizador.

8.4.2. Extracción de ADN genómico

1. El micelio del que se quiere extraer el ADN genómico hay que pulverizarlo bien. Esto se puede hacer bien machacando en mortero con nitrógeno líquido o bien congelando y liofilizando el micelio, para machacarlo posteriormente.
2. Se toman 0,2-0,4 g de micelio liofilizado y se homogenizan en 3 ml de Tampón de Extracción.
3. Añadir 200 µl de SDS 10 %. Incubar a 65 °C durante 30 min.
4. Añadir 900 µl de Solución 3. Mantener en hielo 30 min.
5. Centrifugar a 12000 g durante 10 min.
6. Filtrar el sobrenadante a través de papel Miracloth®.
7. Añadir un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Mezclar por inversión.
8. Centrifugar a 12000 g durante 10 min a 4°C. Repetir los pasos 7 y 8.
9. Tomar la fase acuosa y añadir 2 volúmenes de etanol 96%. Mantener 30 min a -20°C.
10. Centrifugar a 12000 g durante 20 min a 4°C.
11. Descartar el etanol y añadir al precipitado 3 ml de etanol 70 %.
12. Centrifugar a 12000 g durante 5 min a 4°C.
13. Resuspender en 500 µl de tampón TER. Incubar a 37°C durante 30 min.
14. Añadir un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Mezclar por inversión.
15. Centrifugar a 15000 g durante 5 min.
16. Tomar la fase acuosa y añadir lentamente sobre la pared del tubo un volumen de isopropanol a -20°C agitando el tubo. Comprobar que el ADN forma una madeja de color blanquecino en la interfase y recuperar con un asa de vidrio.
17. Secar la madeja y resuspenderla en 100 µl de TE.

Tampón de Extracción: 20 mM de EDTA en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5.

Solución 3: Acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 11,5 % (v/v). Lleva este nombre por ser la misma solución que se utiliza en la extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.

Tampón TER: 1mM de EDTA en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5. Añadir ARNasa A hasta 25 µg/ml.

Tampón TE: 1mM de EDTA en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

Notas: Es muy importante no agitar violentamente los tubos, para evitar así roturas mecánicas del ADN que reduzcan el tamaño medio de los fragmentos obtenidos. Para homogeneizar se puede simplemente pipetear, aunque también se puede utilizar una varilla

de vidrio engrosada en su extremo con Parafilm®. Utilizar en todas las manipulaciones puntas de pipeta cortadas previamente. El paso 16 está descrito para obtener un ADN de una calidad muy alta, útil, por ejemplo, para hacer genotecas. Si se quiere utilizar para hacer análisis tipo Southern, se puede simplificar el protocolo mezclando por inversión cuando añadir el isopropanol y centrifugando 15000 g durante 5 min, para seguir en el paso 17.

8.4.3. Extracción de ARN total

Este protocolo está modificado del propuesto por Chomzynski & Sacchi (1987).

1. Utilizar unos 15 mg de micelio (peso húmedo) o diez veces más si es micelio liofilizado. En el primer caso el micelio debe conservarse a -80°C .
2. Utilizar viales de 1,5 ml adecuados para uso en un homogenizado Mini Bead Beater (Biospec Products). En estos viales mezclar el micelio y 1,3 ml de tampón EFA. Añadir 3 bolas de acero inoxidable de 2,3 mm de diámetro.
3. Homogeneizar a 5000 rpm durante 30 s.
4. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4°C .
5. Recuperar el sobrenadante y añadir 130 μl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Agitar enérgicamente durante 15 s.
6. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4°C .
7. Tomar la fase acuosa y añadir 650 μl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar enérgicamente durante 15 s.
8. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4°C .
9. Repetir los pasos 7 y 8 hasta que la interfase entre la fase polar y apolar esté limpia (unas tres veces en total suele ser suficiente).
10. Recuperar la fase acuosa y añadir una décima parte de volumen de acetato sódico 3 M (tratado con DEPC) y 2,5 volúmenes de etanol 96 %. Mezclar bien.
11. Centrifugar a 15000 g durante 10 min a 4°C .
12. Descartar el etanol y añadir al precipitado 1 ml de etanol 70%. Agitar.
13. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4°C .
14. Descartar el etanol y resuspender el precipitado en 30 μl de agua desionizada tratada con DEPC. Conservar a -20°C o a -80°C si no se va a usar inmediatamente.

Tampón de Extracción: isotiocianato de guanidinio 4 M y lauril-sarcosina al 0,5% en tampón citrato sódico 25 mM a pH 7.

Tampón EFA: Añadir al Tampón de Extracción 7 μl de 2-Mercaptoetanol por cada ml de tampón. Añadir un volumen de fenol ácido y mezclar.

Notas: En la manipulación del ARN es esencial utilizar siempre guantes. Las soluciones de acetato sódico 3 M y de agua desionizada deben ser tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC), añadiendo 1 ml de DEPC por cada litro de solución a tratar. A continuación se agita enérgicamente para dispersar el producto y se autoclava. El etanol 70% debe ser rebajado desde etanol 96 % utilizando agua tratada con DEPC.

Fenol ácido: Añadir a una cantidad de fenol sólido (para análisis) agua destilada. Disolver y calentar a 55°C. Repetir el proceso hasta que el fenol esté saturado de agua; esto es, hasta que al añadir más agua sólo aumente el tamaño de la fase acuosa.

9. Manipulación de ácidos nucleicos

9.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm de 1 µl de ADN o de ARN disuelto en 100 µl de agua destilada. Se asume que 1 unidad de OD equivale a una concentración de 50 µg/ml para el ADN de doble cadena, de 40 µg/ml para el ARN y de 37 µg/ml para los oligonucleótidos.

9.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se llevaron a cabo en el tampón indicado por el fabricante y con 1 U de la enzima indicada (Roche) a la temperatura recomendada en un volumen final de 25 µl. Si se realizan digestiones con dos enzimas que no tienen un tampón compatible utilizar un tampón especial. Este tampón, concentrado diez veces, está compuesto de: acetato magnésico 0,1 M, acetato potásico 0,5 M y Tris-acetato 0,1 M a pH 7,5. Si se realizan digestiones parciales, realizar diluciones seriadas de la enzima en su tampón de reacción (1/2, 1/4, 1/8, 1/16,...) que se utilizan en la reacción como se ha descrito.

9.3. Generación de extremos romos

El rellenado de extremos 5' prominentes y la degradación de extremos 3' prominentes provocados por cortes de enzimas de restricción se realizaron usando la enzima Polimerasa de Klenow (Roche).

Añadir al ADN, bien directamente tras una digestión bien resuspendido en agua desionizada, 1 µl de dNTPs 0,5 mM y 2 U de Polimerasa de Klenow por cada 50 µl. Incubar la reacción a 30°C durante 30 min. Detener la reacción calentando a 75°C durante 10 min o bien añadiendo un volumen de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), agitando enérgicamente y separando las dos fases centrifugando a 15000 g durante 5 min.

9.4. Desfosforilación de plásmidos

Añadir a 1-20 pg de ADN cortado 1 U de fosfatasa CIP (Calf Intestine Phosphatase, Roche). La reacción se lleva a cabo en Tampón de Fosfatasa Alcalina. Incubar a 37°C durante 60 min. Detener la reacción calentando a 75°C durante 10 min o bien añadiendo un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitando enérgicamente y separando las dos fases centrifugando a 15000 g durante 5 min.

Tampón de Fosfatasa Alcalina 10x: 1 mM EDTA en tampón Tris-HCl 0,5 M a pH 8,5.

9.5. Ligación

Para las ligaciones se utiliza la enzima Ligasa del fago T4 (Roche), añadiendo 1 U de enzima y utilizando el tampón proporcionado por el fabricante. La reacción se lleva a cabo en un volumen de 10 μ l y se incuba 12 h a 12-14°C. A las reacciones de ligación entre extremos romos añadir 2 μ l de PEG 8000 20 % (p/v).

9.6. Reacción en cadena de la polimerasa

9.6.1. Reacción clásica

Para las reacciones de PCR utilizando Taq Polimerasa convencional (Roche), mezclar 1 μ l de cada oligonucleótido a 5 μ M, 1 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno de ellos), 5 μ l de tampón 10x, ADN molde, agua desionizada hasta un volumen final de 50 μ l y 1 U de Taq Polimerasa. Salvo que se indique lo contrario, las reacciones se realizan con 1,5 mM de MgCl₂.

Típicamente, las reacciones tienen un primer ciclo a 94°C durante 2 min, 35 ciclos que consisten en 1 min a 94°C, seguido de 30 s a la temperatura establecida empíricamente para cada par de oligonucleótidos, y, finalmente, un tiempo aproximado de 1 min por cada kilobase a amplificar a 72°C. Al final de esos 35 ciclos la reacción se mantiene 7 min a 72°C.

9.6.2. Reacción con enzimas de alta fidelidad

Para las reacciones de PCR utilizando Taq Polimerasa de Alta Fidelidad (Expand High Fidelity[®], Roche), mezclar 3 μ l de cada oligonucleótido a 5 μ M, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 5 μ l de tampón 10x, ADN molde, agua desionizada hasta un volumen final de 50 μ l y 1 U de polimerasa. Salvo que se indique lo contrario, las reacciones se realizan con 1,5 mM de MgCl₂. Las mezclas se hicieron siguiendo el orden descrito por el fabricante.

Estas reacciones se realizan en dos pasos: 10 ciclos normales y 20 ciclos aumentando el tiempo de elongación en 5 segundos cada ciclo.

9.6.3. Reacción para moldes largos

Para las reacciones de PCR utilizando Taq Polimerasa para Moldes Largos (Expand Long Template[®], Roche), mezclar 3 μ l de cada oligonucleótido (5 μ M), 3 μ l de dNTPs 10 mM, 5 μ l de tampón 10x, ADN molde, agua desionizada hasta un volumen final de 50 μ l y 1 U de polimerasa. Salvo que se indique lo contrario, las reacciones se realizan con 1,5 mM de MgCl₂. Las mezclas se hicieron siguiendo el orden descrito por el fabricante.

Estas reacciones se realizan en dos pasos: 10 ciclos normales y 20 ciclos aumentando el tiempo de elongación en 20 segundos cada ciclo.

9.7. Precipitación de ácidos nucleicos

El ADN se precipita añadiendo a la solución una décima parte del volumen de acetato sódico 3 M a pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 96% a -20°C . Mezclar bien. Mantener 30 min a -20°C . Centrifugar a 15000 g durante 10 min. Retirar el etanol y añadir 1 ml de etanol 70 %. Agitar enérgicamente. Centrifugar a 15000 g durante 3 min. Retirar el etanol. Secar el precipitado y resuspenderlo en el volumen deseado de agua desionizada.

Si el fragmento de ADN que se desea precipitar es de un tamaño inferior a las 500 pb, el protocolo a seguir es igual salvo que añadir al ADN la mitad del volumen de acetato amónico 7,5 M y se mantiene a -20°C durante un mínimo de 8 horas.

9.8. Separación de ácidos nucleicos

9.8.1. Electroforesis de ADN

9.8.1.1. En agarosa

Los fragmentos de ADN se separan según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración típica de 0,8 % (p/v). Si se utiliza ADN genómico la concentración debe ser de 0,7 % (p/v). La agarosa añadir al volumen necesario de tampón TAE 1x, calentándose hasta que se disuelva. Para poder visualizar el ADN, añadir bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ antes de que el gel solidifique. A las muestras se les añade el volumen requerido de Tampón de Carga. El gel con las muestras cargadas se somete a un campo eléctrico de 5-12 V/cm de gel. Posteriormente se ilumina con luz UV para visualizar el ADN. Como patrones de peso molecular se usan marcadores comerciales.

En las electroforesis de ADN genómico que posteriormente se van a transferir a un filtro (para una hibridación tipo Southern) se aplica primero un voltaje de 5 V/cm de gel, para que las muestras entren rápidamente en el gel, y, a continuación, se cambia el voltaje de 2 V/cm de gel.

TAE 50x: EDTA 50 mM en Tris-acetato 2 M a pH 8.0.

Tampón de Carga 6x: 40 % (p/v) sacarosa, 0,25 % (p/v) azul de bromofenol. Se puede añadir 0,25 % (p/v) xileno cianol FF. Almacenar a 4°C .

9.8.1.2. En acrilamida

Los fragmentos de ADN menores de 500 pb se separan mediante electroforesis en geles de acrilamida a un porcentaje variable entre 5-10 %. Los geles se preparan en tampón TBE 1x, a los que, para polimerizar la acrilamida, añadir 70 μl de persulfato amónico 10% (p/v) y 3,5 μl de TEMED. A las muestras se les añade el volumen requerido de Tampón de Carga. El gel con las muestras cargadas se somete a un campo eléctrico de 5-12 V/cm de gel. Para visualizar el

ADN, el gel se sumerge en una solución de bromuro de etidio a 0,5 µg/ml durante 10 min y se lava posteriormente en agua destilada durante 10 min. A continuación se ilumina con luz UV para visualizar el ADN. Como patrones de peso molecular se usan marcadores comerciales.

Acrilamida 30 %: 29 % de acrilamida y 1 % N,N'-metilenbisacrilamida en agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente en oscuridad. Cuando se prepara conviene desgasificar la solución en un kitasato.

TBE 5x: EDTA 10 mM en Tris-borato 0,45 M a pH 8.0.

9.8.2. Electroforesis de ARN

Las distintas especies de ARN se separan según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % preparados de la siguiente manera. Añadir la agarosa a un volumen determinado de agua desionizada tratada con DEPC. Se calienta hasta que la agarosa se disuelva. A continuación se mantiene en un baño hasta que la temperatura 55°C durante 10-15 min. Seguidamente, añadir un décima parte del volumen de Tampón MOPS y formaldehído hasta una concentración final de 0,7 M. Se deja solidificar el gel sobre la cubeta en la que se va a realizar la electroforesis.

Las muestras de ARN se tratan de la siguiente manera: a 10 µg de ARN añadir 2 µl de MOPS 10x, 3,5 µl de formaldehído 12,3 M y 10 µl de formamida pura en un volumen final de 20 µl. La mezcla se calienta a 65°C durante 15 min y, posteriormente, se les añade la cantidad necesaria de Tampón de Carga. Las muestras se separan en el gel de la electroforesis sumergido en tampón MOPS 1x sometidas a un campo eléctrico de 7 V/cm de gel.

Tampón MOPS: Disolver MOPS a 0,2 M y acetato sódico a 80 mM en agua tratada con DEPC. Ajustar el pH a 7 con NaOH 2 N. Añadir EDTA hasta 10 mM. Si para hacer el tampón se parte de soluciones concentradas, éstas deben ser preparadas en agua tratada con DEPC. El tratamiento con DEPC está descrito en el apartado 7.3.2. El tampón ya preparado se filtra a través de una membrana de tamaño de poro de 0,2 µm y se guarda en oscuridad.

Tampón de carga: Glicerol 50% (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol FF 0,25% (p/v), EDTA 1 mM a pH 8. Se prepara en agua desionizada tratada con DEPC.

9.9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles

9.9.1. Extracción con sílica

1. Recortar la banda del gel de agarosa. Se puede guardar a 4°C.
2. Añadir dos o tres volúmenes de NaI 6 M.
3. Calentar a 55°C hasta que la agarosa se funda.
4. Añadir 10 µl de Sílica. Mezclar. Incubar 5 min en hielo.
5. Centrifugar a 15000 g durante 20 s
6. Lavar el precipitado con 500 µl de Tampón de Lavado. Agitar enérgicamente.

7. Repetir pasos 5 y 6 dos veces más.
8. Resuspender el precipitado en 10 μ l de agua desionizada.
9. Calentar a 55°C durante 10-15 min.
10. Centrifugar a 15000 g durante 2 min.
11. Recoger el sobrenadante y guardar a -20°C.

Silica: Añadir 1 g de Silica (Sigma, S5631) a 10 ml de tampón PBS (NaCl 130 mM en fosfato sódico 10 mM a pH 7,2). Mezclar bien. Dejar decantar durante 2 horas y repetir el proceso. Centrifugar a 2000 g durante 2 min y resuspender el precipitado en NaI 3 M, de manera que queda a 100 mg/ml. Guardar a 4°C en oscuridad.

NaI 6 M: Añadir 45 g de NaI a 50 ml de agua destilada. Disolver bien. Añadir 5 g de Na₂SO₃ y agitar en un agitador magnético durante 1 hora. Filtrar a través de una membrana de 0,2 μ m. Guardar a 4°C en la oscuridad.

Tampón de Lavado: NaCl 0,2 M, EDTA 2 mM en Tris-HCl 20 mM a pH 7,2. Disolver todo en la mitad de volumen y añadir etanol para una concentración final de 53%.

9.9.2. Extracción con fenol

Este protocolo se usa para fragmentos de agarosa muy grandes.

1. Añadir un volumen de fenol a la banda recortada. Machacar la banda hasta pulverizarla. Se pueden hacer varios ciclos de congelación y calentamiento a 55°C.
2. Centrifugar al muestra, congelada o no, a 15000 g durante 5 min.
3. Tomar el sobrenadante acuoso y añadir un volumen de fenol. Agitar enérgicamente.
4. Centrifugar a 15000 g durante 5 min.
5. Recoger la fase acuosa y precipitar con etanol y acetato de sodio como se ha descrito.

9.9.3. Extracción en minicolumnas

Introducir la banda en la columna Wizard Minicolumns® (Promega) colocada sobre un tubo de 1,5 ml que sirva para la recogida y centrifugar a 15000 g durante 10 min.

9.9.4. Electroelución

Se corta una bloque del gel inmediatamente por debajo de la banda que se quiere aislar con ayuda de una lámpara de mano. Se vacía la cubeta de electroforesis de manera que el tampón llegue sólo hasta la mitad del gel. El hueco se llena de PEG 8000 al 15% (p/v) en TAE 1x. A continuación se aplica corriente eléctrica a 12 V/cm de gel, siguiéndose el curso de la electroforesis con una lámpara de UV de mano. Cuando la banda entra en el pocillo se retira con una pipeta. Añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se

agita enérgicamente. Se centrifuga a 15000 g durante 5 min y posteriormente se toma la fase acuosa.

9.9.5. Extracción de ADN a partir de bandas de acrilamida

1. Colocar la banda en una punta de pipeta de 1 ml sellada, con lana de vidrio cubriendo el fondo. La punta se coloca en un tubo de 3 ml y éste en uno de 10 ml.
2. Añadir 150 µl de Tampón de Elución. Dejar 8 h en agitación a 37°C.
3. Cortar el extremo sellado de la punta y centrifugar a 2500 g todo el sistema.
4. Recoger el eluido que está en el tubo de 3 ml.

10. Experimentos de hibridación en membrana

10.1. Marcaje radiactivo de sondas

1. Desnaturalizar el ADN (25-50 ng en 13 µl) a 100°C durante 5 min. Pasar inmediatamente a hielo.
2. Añadir 2 µl de una mezcla de dATP, dGTP y dTTP preparada a 0,5 mM de cada uno de ellos; añadir 2 µl de un concentrado 10x de hexanucleótidos comerciales (Roche); 2 U de Polimerasa de Klenow (Roche) y 2 µl de [α^{32}]dCTP (3000 Ci/mmol).
3. Incubar un mínimo de 1 hora a 37°C.
4. Eliminar los nucleótidos no incorporados haciendo pasar la muestra a través de una columna de Sephadex® (Amersham Pharmacia Biotech) G-50.
5. Desnaturalizar la sonda a 100°C durante 5 min. Pasar inmediatamente a hielo. Guardar a -20°C si no se va a usar en el momento.

Columnas de Sephadex® G-50: El Sephadex® G-50 se prepara hirviendo o autoclavando 5 g en 75 ml de tampón TE. Si no se dispone de columnas comerciales, éstas se pueden construir con dos tubos de 1,5 ml, uno sobre otro, teniendo el superior un pequeño agujero (hecho con una aguja hipodérmica) cubierto de lana de vidrio siliconizada. Los tubos se sitúan dentro de un tubo de 10 ml. Al tubo de 1,5 ml superior se le añade 1 ml de Sephadex® G-50 (preparado como se ha descrito) y se centrifuga en una centrifuga de rotor basculante a 900 g durante 3 min. Se descarta el tampón que ha eluido a través de la columna y que ha sido recogido en el tubo inferior. Se aplica la sonda marcada (con un volumen completado hasta 100 µl) sobre la columna ya empaquetada y se centrifuga a 900 g durante 3 min, recogiendo la sonda, ya limpia de nucleótidos no incorporados, en un nuevo tubo inferior.

10.2. Transferencia de ácidos nucleicos a membrana

10.2.1. Transferencia de ADN en geles de agarosa a membrana

El ADN se separa en un gel de agarosa como se ha descrito en el apartado

9.7.1.1. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se fotografía bajo luz UV utilizando una regla fluorescente a luz UV (sirve una regla fotocopiada sobre un

acetato), situando el cero sobre los pocillos. De esta manera, tenemos una referencia en centímetros paralela al marcador comercial. A continuación el gel se trata durante 15 min en HCl 250 mM (se observa que los colorantes del tampón de carga cambian de color). Seguidamente, se lava brevemente con agua destilada y se trata durante 30 min en NaOH 0,4 N (se observa un nuevo cambio de color en los colorantes).

La transferencia se realiza en un sistema de vacío con un TransVac TE80 (Amersham Pharmacia Biotech) de la siguiente manera. Sobre la rejilla metálica se colocan dos trozos de papel Whatman® 3MM empapados en NaOH 0,4 N que la cubran casi completamente. Sobre ellos, se coloca la membrana Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) que ha sido primero humedecida en agua destilada y después en NaOH 0,4 N. Sobre la membrana se coloca el gel ya tratado, eliminando las burbujas, y la máscara plástica que asegura el vacío. Se coloca encima el marco y se conecta la bomba de vacío. Añadir NaOH 0,4 N durante el proceso de transferencia para evitar que se seque el gel. La transferencia se completa en unos 30 min.

A continuación, sobre los pocillos del gel se introduce una aguja hipodérmica que perfora la membrana, señalándose todos los pocillos del gel con un lápiz grueso o un bolígrafo. Seguidamente se retira el gel, se deja secar la membrana (a la que se han transferido los colorantes). El ADN se fija covalentemente irradiando el filtro con luz ultravioleta ($70000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) en el sistema CrossLinker CL 1000 (UVP).

10.2.2. Transferencia de ARN en geles de agarosa a membrana

El ARN se separa mediante electroforesis como se ha descrito en el apartado 9.7.2. A continuación, el gel se lava con agua destilada durante 5 min y posteriormente se lava durante 20-30 min en Solución Desnaturalizante. Entonces se lava brevemente con agua y se trata durante otros 20-30 min en Solución Neutralizante. Cuando este tratamiento ha terminado, el gel se equilibra en tampón SSC 20x.

El gel, ya tratado, se transfiere a una membrana Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridad. Para ello se requiere de un recipiente sobre el que se pueda colocar un puente rígido. Sobre este puente se colocan una o dos tiras de papel Whatman® 3MM que llegan hasta el fondo del recipiente, lleno de tampón SSC 20x. Sobre las tiras, empapadas en el mismo tampón, se coloca el gel, ya equilibrado. Sobre el gel se coloca la membrana, humedecida previamente en agua destilada y después en SSC 20x. Eliminar las burbujas alisando con una varilla. Sobre la membrana se coloca un trozo de papel Whatman® 3MM y una pila de 3-4 cm de papel absorbente o papel de filtro. Sobre dicha pila se coloca una superficie plana, sobre la que se pone un peso de uno 500 g. Todos los papeles, filtros y membranas deben ser del mismo tamaño. En cualquier caso, para evitar que en el

sistema se produzca un cortocircuito se puede colocar alrededor del gel un marco hecho con tiras de Parafilm[®], que evite el contacto de la pila de papel con las tiras que están en contacto con el tampón. El sistema se mantiene un mínimo de 8-10 h. El ARN se fija covalentemente irradiando el filtro con luz ultravioleta (70000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) en el sistema CrossLinker CL 1000 (UVP).

Una vez transferido el ARN puede teñirse sobre el filtro bañando el filtro durante 3 min en una Solución de Tinción. A continuación se lava con agua destilada hasta que las bandas de ARN ribosómico son visibles. La tinción se lava completamente utilizando una Solución de Destinción.

Solución Desnaturalizante: NaOH 50 mM y NaCl 10 mM.

Solución Neutralizante: Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

SSC 20x: NaCl 3 M y citrato trisódico 0,3 M, a pH 7.

Solución de Tinción: Azul de metileno 0,02 % (p/v) en acetato sódico 0,3 M a pH 5,2.

Solución de Destinción: SSPE 0,2x y SDS 1%. La solución concentrada de SSPE 20x está descrita en el apartado 10.3.2.

10.2.3. Transferencia a membrana de ADN de colonias

Las colonias que se quieren analizar se replican a cajas de LB con el medio cubierto por una membrana de nylon o nitrocelulosa (debe replicarse una caja gemela sin membrana). Las membranas son perforadas asimétricamente, rotulándose el lugar del pinchazo en la caja. Las cajas se incuban durante 6-8 h, hasta que se observa crecimiento de las bacterias sobre la membrana. Se separa la membrana y se sitúan, con las bacterias hacia arriba, sobre papeles Whatman[®] 3MM empapados en las siguientes soluciones: 1º) SDS 10 % (p/v), se incuba 10 min; 2º) Solución Desnaturalizante, durante 5 min; 3º) Solución Neutralizante, durante 5 min, y 4º) SSC 2x, durante 5 min. A continuación se dejan secar las membranas, fijándose como se ha descrito si son de nylon (apartado 10.2.1), y con el doble de energía si son de nitrocelulosa.

Solución Desnaturalizante: NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M.

Solución Neutralizante: NaCl 1,5 M en Tris-HCl 1 M a pH 7,4.

10.2.4. Transferencia a membrana de ADN de bacteriófagos

Para transferir el ADN de los fagos de calvas de lisis a una membrana de nailon o de nitrocelulosa se sitúa dicha membrana, sobre la caja. Las membranas son perforadas asimétricamente, rotulándose el lugar del pinchazo en la caja. Se mantienen así durante 2 min. A continuación se procesan como en el apartado 10.2.3, pero eliminando el tratamiento con SDS.

10.3. Hibridación de ácidos nucleicos

10.3.1. Hibridación ADN-ADN

Las hibridaciones utilizando (proveniente de un gel, de fagos o de bacterias) ADN fijado a filtro y una sonda de ADN marcado radiactivamente se realizan de la misma manera. Los filtros se sumergen en el mínimo volumen posible de Solución de Hibridación, manteniéndose con agitación (en horno o en un baño) a 42°C durante 1 hora. Seguidamente añadir la sonda hasta una cantidad de radioactividad total de 10^6 cpm/ml de solución de hibridación, marcada radiactivamente según el apartado 10.1, y se mantiene en agitación durante 10-12 horas como mínimo. A continuación se retira la Solución de Hibridación y se lava consecutivamente con las siguientes soluciones: dos veces con Solución de Lavado 0 a temperatura ambiente durante 5 minutos; dos veces con Solución de Lavado I a temperatura ambiente durante 5 minutos; una vez con Solución de Lavado I a 50°C durante 30 min, y, finalmente, una vez con Solución de Lavado I a 65°C durante 30 min. De manera opcional, se puede lavar durante con Solución de Lavado II a 65°C durante 30 min. Si se requiere un lavado suave se realizan sólo los pasos que son a temperatura ambiente.

Una vez lavado, se envuelve el filtro en plástico transparente para evitar que se seque. Se expone a película Kodak X-OMAT S o Kodak Biomax MR a -80°C.

Solución de Hibridación: Tampón fosfato sódico 25 mM a pH 6,5, SSC 6x, Denhardt 5x, SDS 0,5%, ADN desnaturalizado de esperma de salmón 0,1 mg/ml y formamida al 50% (v/v). Si se requieren condiciones de hibridación menos restrictivas, se utiliza la formamida sólo al 35 % (v/v).

Esperma de salmón: preparado como se describe en el apartado 7.2.

Denhardt 50x: Ficoll 400 2% (p/v), polivinilpirrolidona 2% (p/v) y seroalbúmina bovina 2% (p/v). Filtrar a través de Miracloth® (Calbiochem). Guardar en alícuotas a -20°C.

Solución de Lavado 0: SDS 0,5% (p/v), SSC 2x.

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

Solución de Lavado II: SDS 0,1% (p/v), SSC 0,2x.

SSC 20x: ver apartado 10.2.2.

10.3.2. Hibridación ADN-ARN

Las hibridaciones realizadas con ADN marcado radiactivamente sobre ARN fijado a filtro se realizan de la siguiente forma. Los filtros se sumergen en el mínimo volumen posible de Solución de Hibridación, manteniéndose con agitación (en horno o en un baño) a 42°C durante 1 hora. Seguidamente añadir la sonda, marcada radiactivamente según el apartado 10.1, y se mantiene en agitación durante 10-12 horas como mínimo. A continuación se retira la Solución de Hibridación y se lava y expone a película de autoradiografía como se ha descrito en el apartado 10.3.1.

Solución de Hibridación: SSPE 5x, Denhardt 5x, SDS 0,1 % (p/v), ADN desnaturalizado de esperma de salmón y formamida al 50% (v/v).

Solución SSPE 20x: NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 0,2 M y EDTA 20 mM. Se mezclan los productos y se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 10 N. A medida que se acerca el pH a 7,4, se produce la disolución de los componentes, bajando el pH de nuevo, por lo que el proceso de ajuste del pH exige especial atención.

10.4. Deshibridación de membranas

La radiactividad fijada a las membranas puede eliminarse hirviendo el filtro en SDS 0,1% durante 10 min. Si persiste la marca se repite el proceso. Es necesario que la membrana no se seque para que la radiactividad pueda ser eliminada completamente.

11. Obtención de preparados de proteínas de hongos filamentosos

11.1. Extractos totales

Para la obtención de extractos de proteínas totales, el micelio se pulveriza en un mortero utilizando nitrógeno líquido si no estaba liofilizado. A continuación, un volumen de micelio se homogeneiza en tres volúmenes de Tampón de Extracción a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifuga a 5000 g durante 5 min, guardando el sobrenadante obtenido a -20°C.

Tampón de Extracción: Glicina 50 mM en Tris-HCl 20 mM a pH 8. Añadir también 1 mM PMSF, 1 µM pepstatina y 1 µM bestatina.

11.2. Concentración de proteínas de sobrenadantes

Los cultivos se filtran a través de papel o Miracloth® (Calbiochem) para separar el micelio del sobrenadante. Al sobrenadante se le añaden 51,6 g de sulfato amónico por cada 100 ml (lo que representa un 80 % de saturación a 4°C). Se agita a temperatura ambiente hasta que se ha disuelto toda la sal. A continuación se mantiene a 4°C un mínimo de dos horas. Después se centrifuga durante 35 min a 25000 g. Se descarta el sobrenadante, y el precipitado se resuspende en el menor volumen posible de agua destilada.

Para eliminar las sales, las muestras se dializan en el tampón adecuado o en agua destilada. Para ello, se utilizaron tripas de diálisis de límite de exclusión de 12 kDa, tratadas convenientemente. La diálisis se mantuvo a 4°C durante 10-16 horas, cambiándose el tampón un total de tres veces. Después, el contenido de la tripa se centrifuga a 15000 g durante 5 min a 4°C, guardándose el sobrenadante obtenido a -20°C.

Tratamiento de tripas: Hervir en NaHCO₃ 30 mM y EDTA 0,5 mM. Enjuagar con agua destilada abundante. Si no se van a usar, almacenar a 4°C en etanol 15 %.

12. Cuantificación de proteínas

12.1. Método de Bradford

Se utiliza el reactivo BioRad Protein Assay (BioRad). En el ensayo se utilizan 950 μl de reactivo diluido (8 partes de reactivo en 31 de agua) y la muestra en un volumen de 30 μl y se completa con 20 μl de agua destilada hasta 1 ml. Se incuba a temperatura ambiente durante 10-15 min y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteínas se extrapola mediante una recta de regresión obtenida de valorar 1, 5, 10, 15 y 20 μg de seroalbúmina bovina fracción V (Sigma) disueltos en 20 μl de agua destilada y añadidos a 950 μl de reactivo diluido y 30 μl del tampón en el que se han disuelto las muestras de nuestro interés.

12.2. Método de Lowry

La determinación de la cantidad de proteínas por este método se realiza por el método de Lowry *et al.*, (1951). 500 μl de la muestra añadir a 150 μl de agua destilada, 200 μl de NaOH 1N y 1,5 ml de reactivo de Lowry (preparado usando 9 partes de Reactivo A y 1 parte de Reactivo B). La mezcla se incuba durante 15 min a 30°C. Seguidamente añadir 150 μl de reactivo de fenol Folin Ciocalteus (Merck) diluido en una parte de agua. La mezcla se incuba otros 30 min a 30°C y después se mide la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. La concentración de proteínas se extrapola mediante una recta de regresión obtenida de valorar 5, 10, 20,... hasta 100 μg de seroalbúmina bovina, fracción V (Sigma) disueltos en 500 μl de agua destilada.

Reactivo A: 6 g/l de Na_2CO_3 y 0,75 g/l de $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Reactivo B: 644 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Notas: El reactivo de Folin debe ser manipulado con guantes debido a su toxicidad.

13. Separación de proteínas

13.1. Separación en geles de SDS-PAGE

13.1.1. Preparación de geles y condiciones de electroforesis

Las proteínas se separan por su peso molecular mediante un sistema discontinuo comúnmente conocido por SDS-PAGE (de electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS). Las muestras, en un sistema vertical Mini Protean[®] II (BioRad) se empaquetan primero de un Gel de Empaquetamiento de 1 cm de longitud, para separarse a continuación en el Gel de Separación de unos 5 cm de longitud. La electroforesis en los equipos Mini Protean[®] II se realizan aplicando un campo eléctrico de unos 200 V durante 45 min. Si se utiliza un equipo Hoeffer SE 400 se aplican 25 mA durante 60-180 min.

A las muestras, antes de someterlas a la electroforesis, se les añade Tampón de Carga hasta una concentración 1x, se hierven durante 5 min y se centrifugan a 15000 g durante 5 min. El sobrenadante se carga en el gel de electroforesis. Como patrón de peso molecular se utiliza un marcador comercial.

Gel de Empaquetamiento: Tris-HCl 125 mM a pH 6,8; SDS 0,1 % (p/v), acrilamida-N,N'-metilbisacrilamida al porcentaje deseado, persulfato amónico 0,05 % (p/v), TEMED 0,1 % (v/v).

Gel de Separación: Tris-HCl 375 mM a pH 8,8; SDS 0,1 % (p/v), acrilamida-N,N'-metilbisacrilamida al porcentaje deseado, persulfato amónico 0,05 % (p/v), TEMED 0,05 % (v/v).

Solución concentrada de acrilamida: acrilamida al 29,2 % (p/v) y 0,8 % de N,N'-metilbisacrilamida (p/v). Disolver, desgasificar en un kitasato durante 15 min. Guardar a temperatura ambiente en la oscuridad. Es conveniente repetir este proceso cada cierto tiempo para evitar migraciones anómalas en las electroforesis.

Tampón de electroforesis: Glicina 194 mM, SDS 0,1% (p/v) y Tris 25 mM.

Tampón de carga 4x: Glicerol 10 % (p/v), SDS 2 % (p/v), 2-mercaptoetanol 5 % (v/v), azul de bromofenol 0,00125 % (p/v) en Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,8.

13.1.2. Tinción de geles con azul de Coomasie

Para teñir un gel proveniente de SDS-PAGE se utiliza el colorante Brilliant Blue R-250 (Sigma). Para ello, se baña el gel en la Solución de Tinción durante 30 min. A continuación, se retira dicha solución y añadir Solución de Destinción, manteniéndose hasta que las bandas correspondientes a las proteínas se visualizan claramente.

Para conservar el gel se puede someter a vacío a 70°C sobre un papel Whatman® 3MM o bien seguir el siguiente proceso. Una vez desteñido, lavar el gel en glicerol 3 % (p/v) y etanol 70 % (v/v) hasta que se ponga blanco. Seguidamente, lavar en glicerol 3 % (p/v) hasta que se vuelva transparente. Dejar secar entre dos papeles de celofán previamente empapados en glicerol 3 % (p/v). Para evitar las burbujas, añadir abundante glicerol sobre el gel antes de cubrir con el celofán.

Solución de Tinción: 0,25 % (p/v) Brilliant Blue R-250 (Sigma), 7 % (v/v) ácido acético y 45 % (v/v) de metanol.

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

13.2. Separación por isoelectroenfoque

Las proteínas se separan según su punto isoelectrónico (o pI) utilizando un sistema Multiphor System (Amersham Pharmacia Biotech) y geles preparados a pH 3,5-9,5 (Amersham Pharmacia Biotech). Se usan en el cátodo una tira de papel absorbente empapado en NaOH 1 N y en el ánodo con H₃PO₄ 1 N. Las muestras se aplican sin ningún tipo de tampón de carga en el centro del gel utilizando la tira de plástico suministrada por el fabricante. Se aplica durante 1 hora una corriente de 400 V a 50 mA y 30 W como máximo.

Si se desea teñir los geles con Brilliant Blue R-250, es necesario primero mantener el gel en ácido tricloroacético al 10 % (p/v) durante 1 hora, seguido de un

tratamiento en ácido tricloroacético al 1 % (p/v) durante 6-8 horas como mínimo. A continuación se puede proceder como en el apartado 13.1.2.

13.3. Separación por cromatoenfoque

El cromatoenfoque se utiliza como método de separación y purificación de proteínas, y como método para medir el pI de las proteínas.

Se emplea una columna de vidrio calibrado, modelo C 10/20 (1 cm de diámetro, 20 cm de altura) (Amersham Pharmacia Biotech) con 18 ml de Polybuffer Exchanger 94 (Amersham Pharmacia Biotech), sobre el que añadir 1 ml de Sephadex[®] G-25 (Amersham Pharmacia Biotech), con émbolo AC10 y empaquetada según las instrucciones del fabricante.

Todo el proceso siguiente se lleva a cabo a 4°C. La columna se equilibra con 20 volúmenes de tampón imidazol-HCl 25 mM a pH 7,4 desgasificado. La muestra se dializa en el mismo tampón. La elución se realiza con Polybuffer 74-HCl en agua (1:8) desgasificado y a pH 4.. Se aplica un flujo de 9 ml/h con una bomba peristáltica LKB 10200 conectada a la salida de la columna. Se recogen fracciones de 1,5 ml mediante un colector Frac-100 (Amersham Pharmacia Biotech). Se mide el pH de las fracciones y se ensayan las actividades enzimáticas convenientes.

Para su reutilización, lavar la columna con 5 volúmenes de NaCl 1 M y equilibrar como se ha descrito. Almacenar a 4°C en etanol al 20 %.

13.4. Cromatografía a través de Sepharose[®] unida a concanavalina A

1. Lavar la columna con 10 volúmenes de lecho de Tampón de Unión.
2. Diluir con Tampón de Unión hasta una relación de 3:1 (gel hidratado:tampón), con lo que el gel queda al 50 % (p/v).
3. Empaquetar la columna al flujo más rápido posible.
4. Aplicar la muestra y utilizar un flujo siempre menor del 75 % del máximo posible.
5. Lavar la columna con cinco volúmenes de Tampón de Unión.
6. Eluir la columna con 0,1-0,2 M de α -D-metilmanósido o glucósido. Se puede subir la concentración o bajar el pH a 4 si la unión persiste.

Tampón de Unión: 0,5 M NaCl en Tris-HCl 20 mM a pH 7,4. Si se usa un tampón con pH alrededor de 5, se debe añadir Mn^{2+} y Ca^{2+} a 1 mM.

Regeneración de la columna: Lavar alternativamente tres veces con 2-3 volúmenes de soluciones de pH 8,5 y pH 4,5 que contenga 0,5 M de NaCl. Otra forma, más severa, consiste en lavar la columna con tampón borato 0,1 M pH 6,5 y un detergente no iónico al 0,1 % (p/v). Después de estos tratamientos, equilibrar la columna con 5 volúmenes de Tampón de Unión. La columna se almacena en tampón acetato pH 6 con NaCl 1 M, $CaCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM y 0,01 % (v/v) timerosal como conservante.

13.5. Adsorción a pustulan

1. Mezclar pustulan particulado y la solución de proteínas de manera que quede 1:1 (mg proteína:mg pustulan). Mantener 1 hora en hielo.
2. Centrifugar a 17000 g 10 min a 4°C. Guardar el precipitado y repetir el proceso con el sobrenadante.
3. Lavar los precipitados con tampón fosfato 70 mM a pH 6 y NaCl 1 M.
4. Centrifugar a 17000 g 10 min a 4°C. Lavar el precipitado con agua destilada.
5. Centrifugar a 17000 g 10 min a 4°C. Resuspender el precipitado en tampón acético acetato 50 mM a pH 5,5 con PMSF 1 mM y azida 1 mM.
6. Incubar a 37°C durante 16 h.
7. Centrifugar a 17000 g durante 5 min.
8. Tomar el sobrenadante y dializar frente a agua destilada.

Pustulan particulado:

1. A una solución de pustulan al 1% (p/v) autoclavada añadir dos volúmenes de etanol 96 % y mantener a 4°C durante 10 min.
2. Centrifugar a 17000 g durante 10 min. Lavar el precipitado tres veces con agua destilada.
3. Resuspender en agua destilada hasta dejar el pustulan al 1 % (p/v).

14. Inmunodetección de proteínas en membrana

14.1. Transferencia por método semi seco

Se utiliza un sistema de transferencia Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Cell (BioRad). La transferencia se realiza colocando sobre la placa del ánodo un papel extragrueso, una membrana de Immobilon-P (Millipore), el gel y otra tira de papel extragrueso. Los papeles, la membrana y el gel se empapan en Tampón de Transferencia durante 5-15 min y luego se escurren. La membrana, previamente, debe ser tratada durante 30 s en metanol y luego en agua, antes de ser equilibrada en el tampón. La transferencia se realizó a 25 V durante 25 min. Se comprueba que la transferencia ha funcionado comprobando que los marcadores de tamaño preteñidos se han transferido o, si se utilizan marcadores sin colorante, tiñendo con Solución Ponceau S durante 3 min y destiñendo con agua.

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

Solución Ponceau S: Ponceau S (Sigma, P7767) al 0,5% (p/v) en ácido acético 1% (v/v).

14.2. Inmunodetección mediante anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina

La membrana a la que se han transferido las proteínas se incuba en Solución de Bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. A esta solución añadir el anticuerpo (en el caso del anticuerpo anti-BGN16.2, en una dilución 1:5000 para proteínas extracelulares y 1:1000 para proteínas intracelulares). La

incubación con el primer anticuerpo se mantiene durante 2-12 horas. Seguidamente se lava cuatro veces con Solución de Bloqueo (sin leche desnatada), durante 10 min cada vez. A continuación, añadir el anticuerpo anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina. La incubación se mantiene durante 1 hora. Entonces se lava una vez durante 5 min con Solución de Bloqueo (sin leche desnatada) y tres veces con Solución de Lavado. Añadir sobre la membrana 5-10 ml de Solución de Detección. Cuando aparecen las bandas, lavar abundantemente con agua. Para mantener la membrana, es conveniente cubrirla con un papel transparente de manera que no esté en contacto con el aire.

Solución de Bloqueo: Leche desnatada en polvo (Nestlé) al 5 % (p/v), EDTA 1 mM, NaCl 0,15 M, 0,1 % (v/v) Tritón X-100 y Tris-HCl 10 mM a pH 8.

Solución de Lavado: NaCl 0,15 M en Tris-HCl 50 mM a pH 8.

Solución de Detección: 0,1 M NaCl, MgCl₂ 5 mM, 33 mg/l de NBT, 16,5 mg/l de BCIP en Tris-HCl 0,1 M pH 9,5. Preparar justo antes de usarla. Añadir el NBT y el BCIP a partir de soluciones concentradas.

NBT: 50 mg/ml de nitro blue tetrazolium (Sigma) en 70% (v/v) de N'N'-dimetilformamida. Guardar en oscuridad a -20°C.

BCIP: 50 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato (Sigma) en N'N'-dimetilformamida. Guardar en oscuridad a -20°C.

15. Ensayos de actividad enzimática

15.1. Ensayo de actividad β -glucanasa

15.1.1. Ensayos en solución

Para los ensayos de actividad β -glucanasa se utilizó un método modificado a partir del desarrollado por Somogyi (1952) y Nelson (1957) de determinación de azúcares reductores. Como sustratos se utilizaron pustulan (Calbiochem) para medir actividad β -1,6-glucanasa y laminarina (Sigma) para la actividad β -1,3-glucanasa. El pustulan se prepara en tampón acético-acetato 50 mM a pH 5,5 a 0,5 % (p/v), autoclavando para disolverlo bien y manteniéndolo a 4°C. La laminarina se prepara también en tampón acético-acetato 50 mM a pH 5,5 a 0,5 % (p/v), se disuelve agitando suavemente y se mantiene a 4°C. Para medir actividad β -glucanasa de un extracto de proteínas se sigue el siguiente protocolo:

1. Mezclar 150 μ l de sustrato al 0,5 % (p/v) en tampón acético-acetato 50 mM a pH 5,5 con 50 μ l de muestra.
2. Incubar a 37°C el tiempo deseado.
3. Parar la reacción hirviendo durante 5-7 min.
4. Mezclar 150 μ l de la mezcla con 150 μ l de Reactivo de Somogyi. Agitar suavemente.
5. Calentar a 90°C durante 10 min. Enfriar en hielo.
6. Añadir 150 μ l de Reactivo de Nelson. Agitar enérgicamente.

7. Añadir esta mezcla a un tubo con 1,5 ml de agua destilada. Incubar 15 min a temperatura ambiente.
8. Mediar la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm.

La cantidad de glucosa liberada en el ensayo se extrapola a partir de una recta realizada con 10, 20, 30, .. 70 μg de glucosa en 200 μl de tampón acético acetato, de los cuales se procesan con el resto de las muestras sólo 150 μl . Así, se define la unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 mmol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones de ensayo descritas.

Solución Somogyi I: Disolver 15 g de $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 30 g de Na_2CO_3 en 300 ml de agua destilada. Disolver. Añadir 20 g de NaHCO_3 . Añadir 500 ml de Na_2SO_4 al 36 % (p/v) desgasificado. Ajustar hasta 1 litro.

Solución Somogyi II: Mezclar 5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 45 g Na_2SO_4 en 250 ml de agua destilada.

Reactivo Somogyi: Mezclar 4 partes de solución I por una parte de solución II antes de usar.

Nelson: Disolver 12,5 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 225 ml de agua destilada. Añadir 10,5 ml de H_2SO_4 concentrado agitando. Añadir 12,5 ml de agua destilada con 1,5 g de $\text{AsO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, mezclando. Este reactivo debe manejarse con guantes debido a su toxicidad.

15.1.2. Ensayos en gel

Los ensayos en gel se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Pan *et al.*, (1989) y Soler *et al.*, (1999). Se puede llevar a cabo usando geles de isoelectroenfoco o geles de poliacrilamida como los descritos en el apartado 13.1.1. eliminando el SDS y el 2-mercaptoetanol. El proceso es el siguiente:

1. Incubar el gel durante 10-15 min en tampón acético-acetato 50 mM a pH 5,5 con agitación.
2. Incubar 30-60 min a 37°C con pustulan o laminarina al 1 % (p/v) en el mismo tampón.
3. Lavar tres veces con agua destilada, 5-7 min cada vez.
4. Incubar el gel en 200 ml de Solución de Tinción durante 5 min. Calentar durante 2 min en un microondas a la máxima potencia.
5. Eliminar la solución y fijar en acético al 7,5 %.
6. A continuación se puede teñir el gel con Brilliant Blue R²⁵⁰ o secarlo como se ha descrito en el apartado 13.1.2.

Solución de Tinción: 3 g de 2,3,5-trifeniltetrazolium cloruro (Sigma T-8877) en 200 ml de NaOH 1 M.

15.2. Ensayo de actividad quitinasa

Para el ensayo de la actividad quitinasa se utilizó el método descrito por Boller & Mauch (1988) y Reissig *et al.*, (1955):

1. Mezclar 200 μ l de muestra, 300 μ l de tampón fosfato potásico 70 mM a pH 6 y 200 μ l de quitina coloidal. Incubar a 37°C durante el tiempo deseado.
2. Inactivar hirviendo durante 7 min.
3. Centrifugar a 15000 g durante 5-10 min. Tomar el sobrenadante.
4. Añadir a 200 μ l de sobrenadante 40 μ l de helicasa 3 % (p/v) (Biotechnics, Francia).
5. Incubar a 37°C durante 1 hora.
6. Tomar 200 μ l de esta mezcla y añadir 40 μ l de tampón borato potásico 0,8 M a pH 9,1.
7. Calentar a 100 °C durante 3 min y enfriar posteriormente en hielo.
8. Añadir 1 ml de Reactivo de *p*-dimetilaminobenzaldehído.
9. Incubar a 37°C durante 30 min.
10. Medir absorbancia a una longitud de onda de 585 nm.

La cantidad de N-acetilglucosamina liberada se extrapola de una recta realizada con 10, 20, 30,... 100 μ g de N-acetilglucosamina. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1mmol de equivalentes de N-acetilglucosamina por minuto en las condiciones de ensayo descritas.

Quitina coloidal: La quitina coloidal se prepara usando quitina en escamas (Sigma) según Jeuniaux (1966):

1. Añadir a 10 g de quitina en escamas 175 ml de HCl 10 N, dejándose toda la noche a 4°C. Mantener después 4 horas a temperatura ambiente.
2. Filtrar a través de un embudo con fibra de vidrio tupida en un matraz con 1 litro de etanol absoluto a -20°C en agitación. Los flóculos de quitina formados se dejan decantar toda la noche a 4°C.
3. Centrifugar durante 10 min a 5000 g. El precipitado se lava varias veces con agua destilada y, finalmente con tampón fosfato potásico 70 mM a pH 6.
4. A 1 ml del precipitado final se le determina el peso seco.
5. Se resuspende la totalidad del precipitado en Tampón fosfato potásico 70 mM a pH 6, a una concentración de 10 mg de peso seco por ml, conservándose a 4°C.

Para los ensayos enzimáticos, dicha solución se diluye en el mismo tampón suplementado con 1 mM de azida sódica, hasta alcanzar una absorbancia de 1 a longitud de onda 600 nm, que equivale a 5 mg de peso seco por ml.

Reactivo *p*-dimetilaminobenzaldehído 10x: 10 % (p/v) dimetilaminobenzaldehído en 87,5 % (v/v) de ácido acético, 3,87 % (v/v) HCl. El reactivo se diluye con 9 volúmenes de ácido acético.

15.3. Ensayo de actividad proteasa

15.3.1. Ensayos en solución

La actividad proteasa se determina mediante una modificación del método desarrollado por Holwerda & Rogers (1992).

1. Mezclar 50 μ l de muestra con 100 μ l de Brij-35 (Sigma) al 0,1 % (p/v), 300 μ l de tampón acetato sódico 0,1 M a pH 5 y 50 μ l de azocaseína (Sigma, A-2765) al 0,6 % (p/v).
2. Incubar a 30°C durante el tiempo deseado.
3. Añadir 200 μ l de ácido tricloroacético al 10 % (p/v).
4. Centrifugar a 15000 g durante 15 min.
5. Medir la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 366 nm.

La cantidad de azocaseína hidrolizada se extrapola a partir de una recta patrón con 30, 60, 90,... 300 μ g de azocaseína en 125 μ l de agua destilada, mezclados con 50 μ l de SDS 10 % (p/v), 200 μ l de tampón acetato sódico 100 mM, 125 μ l de Brij-35 0,1 % (v/v) y 200 μ l de ácido tricloroacético 10 % (p/v). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ g de azocaseína por min en las condiciones de ensayo descritas.

15.3.2. Ensayos en gel

La actividad proteasa puede visualizarse también observando los halos de hidrólisis provocados por las proteasas que han sido separadas en un gel de acrilamida. Para ello, se prepara un gel hecho en tampón acetato potásico 50 mM a pH 5,5 con 2 % (p/v) de agarosa y 1 % (p/v) de seroalbúmina bovina, fracción V (Sigma). Sobre este gel de BSA se sitúa el gel en el que se han separado las proteínas, generalmente un isoelectroenfoque, se envuelven en plástico transparente y se incuban, entre dos cristales y con un peso encima, a 37°C durante el tiempo necesario para visualizar los halos de actividad proteasa. En el caso de los geles de IEF conviene recortar las zonas donde estaban las tiras con tampón para evitar grandes halos de hidrólisis debidas a esas soluciones.

16. Differential Display

La clonación de genes expresados de manera diferencial a diferentes concentraciones de glucosa y pH se llevó a cabo mediante el método conocido por "Differential Display" (Liang & Pardee, 1997).

16.1. Tratamiento de ARN total con ADNasa I

El ARN total se extrae según el apartado 8.4.3. No se debe utilizar ARNm poliadenilado. Sin embargo, sí es necesario eliminar las trazas de ADN genómico que contaminan la preparación de ARN. Se procede de la siguiente forma:

1. Incubar 10-100 μ g de ARN total con 10 U de ADNasa I (libre de RNAasa) en Tampón de ADNasa I durante 30 min a 37°C.
2. Inactivar la ADNasa I añadiendo un volumen de fenol:cloroformo (3:1). Mezclar vigorosamente y mantener 10 min en hielo.
3. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4°C.

4. Tomar la fase acuosa y precipitar el ARN añadiendo 3 volúmenes de etanol en presencia de acetato sódico 0,3 M (tratado con DEPC). Incubar a -80°C durante 30 min.
5. Centrifugar a 15000 g durante 10 min a 4°C .
6. Descartar el etanol y lavar el precipitado con 500 μl de etanol 70 % (hecho con agua tratada con DEPC).
7. Centrifugar a 15000 g durante 5 min a 5°C .
8. Descartar el etanol y resuspender el precipitado en 20 μl de agua desionizada tratada con DEPC. Medir la concentración de ARN.
9. Comprobar la calidad de la preparación separando en un gel 1-3 μg de ARN.
10. Almacenar el ARN a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a -80°C .

Tampón de ADNasa I: KCl 50 mM y MgCl_2 1,5 mM en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3.

Nota: La preparación del material a utilizar con ARN mediante tratamiento con DEPC está descrita en el apartado 8.4.3.

16.2. Transcripción reversa de ARNm

1. Preparar tres reacciones de transcripción reversa. Cada una de ellas se realizará, con un oligo-dT distinto, en 20 μl de volumen final. Mezclar: 9,4 μl de agua desionizada, 4 μl de tampón de Transcriptasa Reversa 5x (suministrado por el fabricante), 1,6 μl de dNTP 250 μM , 2 μl de ARN total libre de ADN diluido hasta 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con agua tratada con DEPC, y 2 μl de oligo-dT ($\text{AAGCT}_{11}\text{M}$ 2 μM , donde M es G, A o C).
2. Incubar a 65°C durante 5 min. Después, incubar a 37°C durante 10 min.
3. Añadir 1 μl de MMLV transcriptasa reversa Superscript[®] II (Gibco BRL) a cada tubo.
4. Incubar a 37°C durante 50 min. Después, incubar a 75°C durante 5 min.
5. Guardar en hielo si se van a usar inmediatamente o mantener a -80°C .

Notas: Los oligo-dT usados son H-T11N set (GenHunter).

16.3. Amplificación por PCR

1. Preparar las reacciones de PCR en un volumen final de 20 μl como sigue: 10 μl de agua desionizada, 2 μl de tampón de PCR 10x, 1,6 μl de dNTP 25 μM , 2 μl de cebador arbitrario 2 μM , 2 μl de $\text{AAGCT}_{11}\text{M}$ 2 μM , 2 μl de la reacción de retrotranscripción, 0,2 μl de α - ^{33}P -dATP, 2 U de Taq Polimerasa. Son, por tanto 24 reacciones para cada condición, ya que se usan 8 cebadores arbitrarios y tres oligo-dT.
2. Incubar como sigue: 94°C durante 30 s, 40°C durante 2 min, 72°C durante 30 s (40 ciclos) y, finalmente 72°C durante 5 min.

Notas: Los cebadores arbitrarios usados son H-AP primer set 10 (GenHunter). La Taq polimerasa recomendada es AmpliTaq® (Perkin-Elmer).

16.4. Separación de fragmentos en PAGE 6 %

1. Preparar un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% en TBE. Utilizar pocillos planos.
2. Mezclar 3,5 µl de cada reacción de PCR con 2 µl de tampón de carga e incubar a 80°C durante 10 min antes de cargar en el gel.
3. Correr las muestras a 2700 V, 100 W y 50°C en un equipo Genomyx LR System (Beckman) o similar.
4. Exponer el gel seco sobre papel o sobre cristal a una película de autoradiografía Kodak Biomax MR (Amersham Pharmacia Biotech). Incubar a temperatura ambiente.

PAGE 6%: En el caso de no utilizar geles ya preparados se pueden hacer mezclando 32 ml de Solución A y 68 ml de Solución B, añadir 6,4 ml de TBE 10x, desgasificar, filtrar a través de membrana de 0,2 µm, y, finalmente, añadir 370 µl de persulfato amónico 10 % (p/v) y 90 µl de TEMED.

Solución A: Acrilamida-N,N'-metilbisacrilamida 20 % (p/v) y urea 45 % (p/v). Disolver 137,25 g de urea en 150 ml de agua desionizada calentando. Enfriar antes de añadir 57,95 g de acrilamida y 3,05 g de N,N'-metilbisacrilamida. Agitar durante 1 hora. Ajustar el volumen hasta 300 ml.

Solución B: 45 % (p/v) urea. Añadir 225 g de urea a 300 ml de agua desionizada. Agitar 1 hora. Ajustar el volumen hasta 500 ml.

16.5. Reamplificación de ADNc

1. Revelar la película. Una vez seca, orientarla sobre el gel aprovechando las líneas de los bordes del gel. Recortar las bandas que tenga una expresión diferencial de nuestro interés. Si el gel está seco en un cristal, marcar los bordes de la banda con una cuchilla, hidratar la banda con 1-2 µl de agua desionizada y pasar a un tubo con 100 µl de 1 mM EDTA en 10 mM de Tris-HCl pH 7,4 y agitarlo enérgicamente o bien, incubar a 37°C durante 30 min. Usar 4 µl para la reamplificación. Si el gel está en papel, se recorta la banda y se hierva en 100 µl de agua desionizada. Centrifugar durante 2 min a 15000 g y guardar el sobrenadante, que se precipita con 10 µl de acetato sódico 3 M, 5 µl de glucógeno (10 mg/ml) y 450 µl de etanol 96 %. Incubar 30 min a -80°C. Centrifugar a 15000 g durante 10 min a 4°C y lavar el precipitado con 200 µl de etanol 85%. Disolver el precipitado en 10 µl de agua desionizada y usar 4 µl para la reamplificación.
2. La reamplificación se lleva a cabo usando los cebadores correspondientes a cada banda y las mismas condiciones de PCR, salvo que los dNTP se usan a 20 µM en lugar de 2-4 µM y que no se usan isótopos. Utilizar un volumen final

de 40 μ l en el que se mezclan: 20,4 μ l de agua desionizada, 4 μ l de tampón de PCR 10x, 3,2 μ l de dNTP 250 μ M, 4 μ l de cebador arbitrario 2 μ M, 4 μ l de oligo dT 2 μ M, 4 μ l de ADNc y 2 U de Taq Polimerasa.

3. Correr las muestras en un gel de agarosa al 1,5 % (p/v) y comprobar su tamaño con el que tenían en el gel desnaturizante de poliacrilamida al 6 %.
4. Subclonar la banda utilizando cualquier vector comercial como pGEM-T easy[®] (Promega), o bien romizar y clonar.

16.6. Northern reverse

16.6.1. Marcaje de las sondas de ADNc

1. Preparar las reacciones de marcaje en un volumen de 50 μ l: añadir 10 μ l de tampón de retrotranscriptasa 5x, 5 μ l de oligo-dT a 10 μ M, 8 μ l de dNTP(-C) a 500 μ M cada uno, 5 μ l de α -[³³P]-dCTP, 10 μ g de ARN y agua hasta 45 μ l.
2. Mezclar bien e incubar a 65 °C durante 5 min. Después incubar 10 min a 37°C.
3. Añadir 5 μ l de transcriptasa reversa MMLV e incubar durante durante 50 min a 37°C.
4. Eliminar los nucleótidos no incorporados como se describe en el apartado 10.1.

16.6.2. Hibridación Dot-Blot

Se utiliza un dispositivo especial para Dot-Blot (Schleicher & Schuell). El uso de membranas cargadas positivamente reduce la duración del proceso, ya que se desnaturaliza el ADN y se transfiere en la misma solución.

1. Cortar la membrana a un tamaño apropiado. Humedecer en agua desionizada durante 10 min.
2. Colocar sobre el dispositivo un trozo de papel Whatman[®] 3MM empapado en agua destilada, y, encima, la membrana. Colocar encima el bloque del dispositivo que contiene los pocillos, cerrando herméticamente.
3. Calentar a 100°C durante 10 min las muestras disueltas en NaOH 0,4 N y EDTA 10 mM. Asegurarse de que se va a cargar la misma cantidad de ADN de cada muestra. Preparar tantos filtros como condiciones en las que se quiera comprobar la expresión del ADN clonado.
4. Aplicar la succión y lavar los pocillos con agua destilada.
5. Aplicar las muestras en los pocillos. Si el pocillo se atasca tocar la membrana muy ligeramente para desplazar la burbuja.
6. Lavar los pocillos con 500 μ l de NaOH 0,4 N y dismantelar el dispositivo.

Lavar la membrana ligeramente en SSC 2x y secar al aire. Fijar con luz ultravioleta (70000 μ J/cm²) en el sistema CrossLinker CL 1000 (UVP).

A continuación, hibridar como se ha descrito en el apartado 10.3.1.

17. Ensayos de antagonismo *in vitro*

17.1. Ensayos de inhibición en medio líquido

Las cepas de *T. harzianum* se cultivan en PDB durante 40 h a 22°C a 250 rpm. Para obtener biomasa de *R. solani* se procede de la siguiente forma: se inocula un bloque de micelio en cajas de PPG, cultivándose durante 7 días a 22°C. A continuación se rasca la superficie del agar con una cuchilla, fragmentando el micelio en un homogeneizador de cristal (Pobel). La suspensión de propágulos obtenida se inocula en 400 ml de PDB, y se incuba a 22°C durante 4 días con agitación a 250 rpm. El micelio de *R. solani* se recoge centrifugando a 15000 g durante 10 min a 20°C y se lava con $MgCl_2$ 0,2 M y H_2O . El micelio de *T. harzianum* se recoge filtrando en un kitasato y lavando de igual manera. Los micelios se pesan y se inoculan conjuntamente en relación 1:1 en MM con glucosa 100 g/l y en MM con glucosa 1 g/l. Se continúa cultivando a 22°C y 250 rpm.

Se toman muestras recogiendo el micelio de *R. solani*, que crece de forma esférica, y se transfiere a cajas de PPG con 5 mg/ml de benlate[®], que contiene un 50 % del fungicida benomilo (Energía e Industrias Aragonesas), donde *T. harzianum* no puede crecer. El radio de crecimiento se mide, y se calcula la velocidad de crecimiento. Relativizando esta velocidad con la que se obtiene de realizar el mismo proceso con un micelio de *R. solani* que ha sido manipulado de la misma manera pero sin ser cocultivado con *T. harzianum* se obtiene el valor de viabilidad relativa a un tiempo de cocultivo dado.

17.2. Ensayos de confrontación en medio sólido

Se colocan discos de micelio de 8 mm de diámetro de *T. harzianum* y de *R. solani*, a 1 cm del borde de una caja de PPG y en extremos opuestos. Las cajas se incuban a 22°C durante 10 días. Cuando el micelio de *T. harzianum* crece sobre el de *R. solani*, se extraen bloques de micelio y se cultivan en PPG con 5 mg/ml de benlate[®]. En este medio no crece *T. harzianum*, y se comprueba así si el micelio de *R. solani* está vivo o no.

CAPÍTULO 1

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA BGN16.2

INTRODUCCIÓN

1. Hidrolasas de *T. harzianum*. Quitinasas

En la introducción de esta tesis ya se habló de enzimas de *T. harzianum* con actividad hidrolítica sobre la pared celular de hongos filamentosos, que parecen desempeñar un papel significativo en la degradación de ésta y, por ende, en el antagonismo que realiza *Trichoderma* sobre aquellos hongos a los que parasita.

Dado que la quitina es el polímero más representado en la mayoría de los hongos, a las quitinasas se les ha supuesto un papel central en el micoparasitismo. De aquí que, de entre las distintas enzimas líticas, es a las quitinasas a las que se ha prestado una mayor atención. En la cepa *T. harzianum* CECT 2413 se han purificado tres proteínas (CHIT42, CHIT37 y CHIT33) (De la Cruz *et al.*, 1992) de las que se han clonado los genes de dos de ellas: *chit42* y *chit33* (García *et al.*, 1994, Limón *et al.*, 1995). En otras cepas de interés en control biológico, como *T. harzianum* P1, se conocen varias enzimas con actividad sobre la quitina: una N-acetilglucosaminidasa CHIT72 (codificada por el gen *nagl*) (Lorito *et al.*, 1994, Peterbauer *et al.*, 1996), una endoquitinasa homóloga a CHIT42 (Harman *et al.*, 1993, Carsolio *et al.*, 1994) y una chitobiosidasa (Harman *et al.*, 1993). El sistema quitinolítico mejor caracterizado es el de la cepa *T. harzianum* TM, de la que se conocen seis enzimas que actúan de manera secuencial durante el proceso de antagonismo (Haran *et al.* 1995, 1996b).

La capacidad antifúngica de las quitinasas aisladas se ha comprobado ampliamente (Lorito, 1998). De ahí que, a la hora de obtener cepas mejoradas para su uso como agentes de control biológico, las quitinasas han sido las primeras enzimas utilizadas. Se han obtenido cepas con mayor capacidad antifúngica por sobreexpresión de varias quitinasas en *T. harzianum* CECT 2413 (Limón *et al.* 1999) y en *T. virens* (Baek *et al.* 1999).

Sin embargo, y atendiendo a la composición de la pared de los hongos (quitina, α - y β -glucanos, mananos, manoproteínas, etc.) (Bartnicki-García, 1968, Leal & Bernabé, 1998), cabe pensar que los enzimas degradadores de glucanos (polímeros de glucosa) pueden tener también un papel importante en el micoparasitismo.

2. Glucanasas

Se conocen enzimas glucanolíticas en plantas, bacterias y hongos. En estos últimos las glucanasas tienen básicamente dos tipos de función: morfogenética, esto es, necesaria para llevar a cabo un proceso de diferenciación (Griffin, 1994) y nutricional, aquella tendente a obtener energía a partir de un glucano propio (Radford *et al.* 1996) o de otro organismo. Estas últimas serían las enzimas utilizadas por los hongos saprófitos o por los patógenos de plantas o de otros hongos.

El glucano más abundante en la Tierra es la celulosa, un homopolímero de D-glucosa con enlaces β -1,4. Las enzimas encargadas de su degradación (endo- β -1,4-glucanasas y celobiohidrolasas) han sido objeto de muchos estudios (Nevalainen & Penttilä, 1995). Otros polímeros vegetales como las hemicelulosas (que engloban un grupo muy heterogéneo en composición de azúcares y enlaces); y las enzimas que los degradan, también han sido estudiados en profundidad (Visser & Voragen 1996).

Los β -glucanos no celulósicos más comunes son los β -1,3-, los β -1,6- y, en menor medida, los β -1,2-glucanos (Pitson *et al.*, 1993). Se han medido actividades β -1,2-glucanasas en varios hongos (Reese *et al.*, 1961), aunque no se conoce la función ni las características de los enzimas que llevan a cabo dicha actividad. Las β -1,3-glucanasas sí se encuentran ampliamente distribuidas en levaduras y hongos filamentosos (Reese & Mandels, 1959, Chester & Bull, 1963, Pitson *et al.*, 1993),

TABLA 1.1. Glucanasas no celulolíticas purificadas de diferentes especies del género *Trichoderma*

Enzima	Origen	PM	pI	Km*	Vmax†	Mecanismo de acción‡	Producto§	Referencia							
β-1,3-glucanasa	<i>T. harzianum</i> CECT 2413	78	8	3.3	75	Endo	G4+G2+G	De la Cruz, <i>et al</i> (1995b)							
	<i>T. harzianum</i>	78	6,2	ND	ND	Exo	G1	Lorito <i>et al.</i> (1994)							
	<i>T. harzianum</i> Tc	36	ND	1.18	1,26	Endo	ND	Noronha & Ulhoa (1996)							
	<i>T. harzianum</i>	31,5	ND	2.08	620	Exo	G1	Kitamoto <i>et al</i> (1987)							
	<i>T. harzianum</i>	40	7,8	0.01	0.3	Exo	G1	Dubordieu <i>et al.</i> (1985)							
	<i>T. harzianum</i> Tc	29	ND	1.72	3.1	ND	ND	Noronha & Ulhoa (2000)							
	<i>T. longibrachiatum</i>	70	7,2	0,065 mM	3,17	Endo	G5+G4+G3 +G1	Tangarone <i>et al.</i> (1989)							
β-1,6-glucanasa	<i>T. reesei</i>	70	4,1	0,28	ND	Exo	G1	Bamforth (1980)							
	<i>T. harzianum</i> CECT 2413	43	5,8	2,4	224	Endo	G2	De la Cruz <i>et al.</i> (1995a)							
									51	7,4	0,8	3,2	Endo	G2+G	De la Cruz & Llobell (1999)

α -1,3-glucanasa	<i>T. viride</i>	47	ND	46 mM	0,16	Endo	G2+G1	Hasegawa & Nordin (1969)
	<i>T. viride</i>	47	ND	7,1 mM	ND	Exo	G1	Tsunoda <i>et al</i> (1977)
	<i>T. harzianum</i> OMZ779	15	ND	ND	ND	Endo	G1	Quivey & Kriger (1993)
	<i>T. harzianum</i> CBS 243.71**	75	ND	ND	ND	Endo	ND	Fuglsang <i>et al.</i> (2000)
Glucoamilasa	<i>T. reesei</i>	66	4,0	0,11	ND	Exo	G1	Yamasaki <i>et al.</i> (1995)
Amilasa	<i>T. harzianum</i>	68.7	ND	3.5	1.67	α -1,4 β -1,6 ND	ND	de Azevedo <i>et al.</i> , (2000)

* mg de sustrato/ml cuando no se indica la molaridad. Depende del peso molecular asignado a los sustratos.

† μ mol de glucosa/min mg de proteína.

‡ Forma de corte y tipo de enlace (cuando no se indica nada, se refiere a la actividad propia de la enzima).

§ Gn indica oligómeros de glucosa de n monómeros de longitud.

** Datos de la proteína recombinante producida en *Aspergillus niger*.

ND: no descrito.

debido probablemente a la presencia de polímeros de glucosa con enlace β -1,3 en las paredes fúngicas. Lo mismo puede decirse de las β -1,6-glucanasas, aunque esta actividad enzimática se encuentra con mucha menor frecuencia que la anterior (Reese *et al.*, 1962, Pitson *et al.*, 1993). Estas tres actividades enzimáticas llevan a cabo funciones morfogénicas y nutricionales en hongos filamentosos de casi todas las divisiones conocidas (Pitson *et al.*, 1993, Benítez *et al.*, 1998a).

Las β -glucanasas se clasifican, además de por el tipo de enlace, por la forma en que hidrolizan los polímeros. Así, actividades *exo* son las que hidrolizan β -glucanos desde el extremo no reductor rindiendo monómeros y actividades *endo* son las que hidrolizan enlaces internos de β -1,3-glucano produciendo oligómeros (de dos, tres o cuatro unidades generalmente) como resultado de su actividad. Se conocen actividades *endo* tanto en β -1,3- como en β -1,6-glucanasas. Sin embargo, no se han descrito actividades *exo*- β -1,6-glucanasa, si bien algunas *exo*- β -glucanasas parecen tener actividad sobre los dos tipos de enlaces (Pitson *et al.*, 1993).

Se ha detectado actividad β -1,3-glucanasa en muchos hongos (Reese & Mandels, 1959), implicada en procesos morfogénicos como la síntesis de pared celular en *Neurospora* (Chiba *et al.*, 1988) o *Trichoderma* (Benítez *et al.*, 1976) o la esporulación de *Saccharomyces* (Cid *et al.*, 1995), o en la generación de glucosa asimilable por hidrólisis de polímeros extracelulares (De la Cruz *et al.*, 1993). *Trichoderma* es quizás el género del que se conocen más componentes del sistema lítico de β -1,3-glucanos. Se han detectado muchas actividades con distintas características, aunque el número de proteínas purificadas es menor. Se conocen tres *endo*- β -1,3-glucanasas y tres *exo*- β -1,3-glucanasas, cuyas características bioquímicas están resumidas en la Tabla 1.1.

Las actividades β -1,6-glucanasa son mucho más raras en la naturaleza. Aún así, se han purificado algunas de estas enzimas en bacterias como *Flavobacterium*

Introducción: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

(Sano *et al.*, 1975) o *Bacillus circulans* (Rombouts & Phaff, 1976) y en levaduras como *Saccharomyces fibuligera* (Mulenga & Berry, 1994) (Tabla 1.2). Sin embargo, en los hongos filamentosos es donde se conocen más datos acerca de la bioquímica y la regulación de la expresión de estas enzimas. Se ha detectado actividad β -1,6-glucanasa (y en algún caso se ha purificado de manera parcial) en diversas especies del género *Trichoderma* (Reese *et al.*, 1962, Dubordieu *et al.*, 1985, Del Rey *et al.*, 1979), *Neurospora* (Del Rey *et al.*, 1979), *Penicillium* (Reese *et al.*, 1962, Santos *et al.*, 1979) y *Sclerotium* (Rapp, 1989) y se han purificado enzimas con actividad β -1,6-glucanasa en *Acremonium persicinum* (Pitson *et al.*, 1996a), *Penicillium brefeldianum* (Schep *et al.*, 1984), *Penicillium italicum* (Santos *et al.*, 1979), *Gibberella fujikuroi* (Shibata & Fukimbara, 1973), *Rhizopus chinensis* (Yamamoto *et al.*, 1974) y *Neurospora crassa* (Hiura *et al.*, 1987) (Tabla 1.2).

En *T. harzianum* CECT 2413, se ha purificado un sistema lítico completo compuesto de tres enzimas con actividad *endo*- β -1,6-glucanasa (De la Cruz *et al.*, 1995a, De la Cruz & Llobell, 1999, Montero *et al.*, 2000). Las propiedades bioquímicas de estas β -1,6-glucanasas están resumidas en la Tabla 1.1.

La actividad β -1,6-glucanasa en *T. harzianum* CECT 2413 es inducible por quitina y, en menor medida, por pustulan (un polímero de β -1,6-glucosa), y es reprimible por glucosa (De la Cruz *et al.*, 1993). De las tres enzimas citadas, la BGN16.2 (pI ligeramente ácido de 5,8) fue la primera que se describió como proteína con carácter antifúngico (De la Cruz, *et al.*, 1995a). Esta proteína no era capaz por sí sola de provocar lisis sobre paredes de hongos, pero en combinación con las quitinasas presentaba un efecto sinérgico (explicado por la estructura de la pared celular) produciendo una lisis importante. Un fenómeno similar se observaba en experimentos de inhibición del crecimiento de hongos como *Botrytis cinerea* y *G. fujikuroi*, aunque, en este caso, la proteína BGN16.2 en solitario sí producía una

inhibición de entre el 20 y el 40%. El gen está regulado de manera que su expresión también es inducible por quitina y, en menor medida, por paredes de hongos y pustulan; y reprimible por glucosa (Lora *et al.*, 1995).

En *Trichoderma* se han purificado también α -glucanasas; concretamente tres α -1,3 y una α -1,4-glucanasa (Tabla 1.1). La función de las amilasas y glucoamilasas es la movilización de las reservas de almidón, mientras que, en el caso de las α -1,3-glucanasas, parece que pueden estar implicadas en la hidrólisis de paredes celulares ricas en este polímero.

3. β -1,6-glucanasas y micoparasitismo

Trabajos recientes realizados en *Saccharomyces cerevisiae* (Kapteyn *et al.*, 1997, Kollár *et al.*, 1997) han demostrado la función que el β -1,6-glucano realiza en la pared celular. Como han definido dichos autores, el β -1,6-glucano es la cola que pega los componentes mayoritarios, que son la quitina y el β -1,3-glucano. De esta manera, el β -1,6-glucano, sintetizado en la propia pared celular (Montijn *et al.*, 1999) se convierte en el aglutinante que interconectaría no sólo la quitina y el β -1,3-glucano, sino también, y a través de glicosilfosfatidilinositol, las manoproteínas. Se explica así que, al combinar β -1,6-glucanasa con quitinasas, se produzca el efecto sinérgico en la degradación de paredes celulares y en la inhibición del crecimiento de hongos (De la Cruz *et al.*, 1995a).

El papel de las glucanasas en el micoparasitismo no sólo debe consistir en proporcionar glucosa para que sea asimilada, sino que probablemente estas enzimas participan activamente en provocar la muerte del hospedador. Algunas β -glucanasas tienen actividad antifúngica por sí sola (Lorito *et al.*, 1994), aunque sigue en discusión el papel de las enzimas líticas en el micoparasitismo (Chet *et al.*, 1998). Esto puede que dependa simplemente de las cepas utilizadas, que hacen que el tipo de interacción que se establece sea diferente en cada caso. De hecho, cepas

TABLA 1.2. Proteínas con actividad β -1,6-glucanasa purificadas en diferentes microorganismos.

Origen	PM	pI	Km*	Vmax†	Producto‡	Referencia
<i>Flavobacterium</i> [§]	59	ND	0,46 μ M	32,1	G	Sano <i>et al.</i> (1975)
<i>Bacillus circulans</i>	54	ND	0,29 mg/ml	9,1	G+G2+G3	Rombouts & Phaff (1976)
<i>Gibberella fujikuroi</i> **	ND	ND	0,12 μ M	ND	G+G2+G3	Shibata & Fukimbara (1973)
<i>Rhizopus chinensis</i>	30,5	ND	9,3 mM	4,3	G2+G3	Yamamoto <i>et al.</i> (1974)
<i>Penicillium brefeldianum</i>	44	ND	2,78 mg/ml	624	G	Schep <i>et al.</i> (1984)
<i>Neurospora crassa</i>	47	ND	0,8 mg/ml	ND	G+G2	Hiura <i>et al.</i> (1987)
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	43	3,95	ND	ND	ND	Mulenga & Berry (1994)
<i>Acremonium persicinum</i>	42,7	4,9	1,28 mg/ml (75,3 μ M)	ND	G2+G3	Pitson <i>et al.</i> (1996)

* mg de sustrato/ml cuando no se indica la molaridad. Ésta depende del peso molecular calculado para cada sustrato utilizado.

† μ moles de glucosa/ min mg de proteína.

‡ Gn indica oligómeros de glucosa de n monómeros de longitud

§ Datos bioquímicos referidos a la gentiopentaosa como sustrato

** Datos bioquímicos referidos al lutean como sustrato

ND: no descrito.

de *T. harzianum* disruptas para la quitinasa CHIT42 pierden capacidad de control sobre *B. cinerea* pero la aumentan sobre *R. solani* (Woo *et al.*, 1999).

4. Sobreexpresión de hidrolasas

La sobreexpresión de hidrolasas para aumentar el potencial lítico de *Trichoderma* y obtener mejores agentes de control biológico ya ha demostrado su eficacia con dos quitinasas (Limón *et al.*, 1999, Baek *et al.*, 1999) y una proteasa (Flores *et al.*, 1997) en *T. harzianum*, y una β -1,4-glucanasa en *T. longibrachiatum* (Migueli *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta el papel las β -1,6-glucanasas en el micoparasitismo, en este trabajo se propuso la obtención de cepas transgénicas de *T. harzianum* que produjeran grandes cantidades de la proteína BGN16.2 (De la Cruz *et al.*, 1995a, Lora *et al.*, 1995).

En *Trichoderma*, principalmente en *T. reesei*, se han sobreexpresado tanto proteínas homólogas como heterólogas. La transformación de la estirpe que se quiere utilizar con vectores que llevan los genes de interés regulados por señales controlables es la estrategia más extendida hoy por hoy para sobreexpresar una proteína (Mäntylä *et al.*, 1998), aunque el uso de agentes mutagénicos y una selección posterior de cepas ha sido, durante mucho tiempo, el proceso utilizado (Montenecourt, 1983).

La expresión de transgenes

Hay dos características fundamentales a tener en cuenta en la expresión de transgenes en hongos filamentosos: el locus de integración y el promotor a utilizar.

a) *El locus de integración.* El modelo más simple de expresión de transgenes se basa en la inserción en el genomio de manera aleatoria de copias del gen que queremos sobreexpresar. Generalmente, suelen ocurrir integraciones de tres tipos (Fincham, 1989): inserciones únicas, inserciones en tándem de varias copias del vector e inserciones aberrantes, que rompen la estructura del vector debido a reorganizaciones no deseadas. No se conoce la naturaleza genómica de las

Introducción: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

zonas donde se integra el ADN que lo hace al azar, y que, probablemente, sea distinta en cada hecho de transformación (Verdoes *et al.*, 1993). Se puede dar el caso de que el ADN se inserte en zonas con un nivel de transcripción bajo, dando lugar a una expresión del transgén de menor intensidad de la esperada (Archer & Peberdy, 1997).

Ante fenómenos de este tipo se ha intentado aislar el transgén o situarlo en un locus con un nivel de transcripción alto. La primera estrategia, aún en desarrollo, implica el uso de secuencias que actúan como aisladores del transgén en relación al ambiente cromatínico en el que se halla. Existen unas secuencias, denominadas MARs (de Matrix Attachment Region), implicadas en la unión de la molécula de ADN a la matriz nuclear, y que parecen ser la base sobre la que se forman los lazos de cromatina (Laemli *et al.*, 1992). Se han clonado en *T. reesei* tres secuencias MARs (Belshaw *et al.*, 1997), aunque aún no se ha probado su influencia en la expresión de transgenes.

La segunda estrategia para evitar efectos de la estructura de la cromatina es la integración dirigida hacia un sitio con un nivel de transcripción conocido. En *T. reesei* se ha utilizado con éxito el locus del gen *cbhl* (Harkki *et al.*, 1991, Suominen *et al.*, 1993, Mäntylä *et al.*, 1998). Este gen codifica la celobiohidrolasa más abundante del sistema celololítico de *T. reesei*, siendo, a su vez, el gen *cbhl* con nivel de expresión más alto (Kubicek & Penttilä, 1998). Es esperable, por tanto, que el locus donde se halla tenga un nivel de transcripción potencialmente alto y sea idóneo para la expresión de transgenes. De hecho, la expresión de *glap* de *Hormononis resiniae* es un 50% más alta en las cepas de *T. reesei* con el gen *cbhl* sustituido que en aquellas que tienen tres copias dispersas (Joutsjoki, 1994). El locus es más importante que el número de copias, ya que si este número es demasiado alto, puede haber una limitación de los factores de transcripción (Karhunen *et al.*, 1993) disminuyendo la expresión de otros genes y provocando un desequilibrio entre el número de copias y la expresión lograda. En el caso del

promotor del gen *cbh1* parece que tres copias son suficientes para saturar el sistema (Karhunen *et al.*, 1993)

b) *El promotor.* En muchos casos, para sobreexpresar un gen, se han utilizado promotores fuertes e inducibles. En el caso del género *Trichoderma* son, generalmente, promotores pertenecientes a genes que codifican enzimas hidrolíticas: de celulasas como *cbh1* (Harkki *et al.*, 1991, Suominen *et al.*, 1993) y *cbh2* en *T. reesei* (Kubicek-Pranz *et al.*, 1991), de glucanasas como *egl1* en *T. longibrachiatum* (Sánchez-Torres *et al.*, 1994), de xilanasas como *xln2* de *T. reesei* (Saarelainen *et al.*, 1993) y de proteasas como *prb1* en *T. harzianum* (Flores *et al.*, 1997). Los promotores de estos genes, unen a la ventaja de ser fuertes, el inconveniente de que son inducibles en condiciones en las que se secretan otras muchas proteínas. Esto que, evidentemente, tiene su utilidad en determinadas condiciones (cambiar la cantidad relativa de una actividad respecto a otras) puede representar un problema si lo que queremos es obtener proteína lo más pura posible.

Como solución a este problema se ha planteado el uso de promotores que sean activos en medios que contengan glucosa, ya que la cantidad de proteínas que se secretan en estas condiciones es extremadamente baja. Para ello se han utilizado promotores de genes implicados en la glucólisis, como el del gen de la piruvato quinasa de *T. reesei* (Kurzatkowski *et al.*, 1996), el de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* en *T. longibrachiatum* (Punt *et al.*, 1991, Ganga *et al.*, 1997) o incluso promotores de genes con función desconocida aislados de *T. reesei* por su alto nivel de expresión en medios con glucosa (Nakari-Setälä & Penttilä, 1995).

La ruta de secreción

Una elección correcta del promotor y del locus de integración puede asegurar un nivel de expresión alto. Sin embargo, ese ARNm debe traducirse y, como es el caso de las proteínas producidas en hongos filamentosos, exportarse al

Introducción: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

exterior de la célula. Para ello, es necesario que tengan péptido señal. Se ha comprobado que fusiones de los genes de interés a las porciones 5' de las secuencias codificantes de proteínas, que son secretadas abundantemente, mejora de manera ostensible los niveles de producción. Es el caso de las fusiones a *cbhl* en *T. reesei* (Margolles-Clark *et al.*, 1996) y a *glaA* en *Aspergillus niger* (Gouka *et al.*, 1997a). Estas fusiones mejoran incluso los niveles de transcripción y traducción, sobre todo en la expresión de genes heterólogos (Gouka *et al.*, 1996, 1997a, 1997b).

La mayoría de las proteínas secretadas por hongos contienen un péptido de activación, con un sitio de corte para una proteasa tipo KEX2 (Bussey, 1988). Esta actividad ha sido caracterizada en *T. reesei*, donde se ha demostrado que tiene un papel esencial en la secreción (Goller *et al.*, 1997). Una estrategia común en la expresión heteróloga es la construcción de genes quiméricos con una porción 5' de una proteína fúngica que se expresa a una tasa de transcripción y traducción alta, separada de la proteína de interés por un sitio sensible a la proteasa KEX2. De esta manera se logran niveles de producción muy altos (Moralejo *et al.*, 1999).

También juega un papel importante en la secreción de proteínas la glicosilación. En el caso de *T. reesei*, la actividad sintetasa de MPD (manosilfosfoinositol) aumenta cuando los niveles de secreción son altos (Kruszewska *et al.*, 1990). De hecho, la expresión del gen DPM1 de *S. cerevisiae* en *T. reesei* provoca un aumento en la tasa de secreción de *cbhl* de siete veces (Kruszewska *et al.*, 1999a). Esto demuestra que la glicosilación puede representar un paso limitante en la sobreexpresión de proteínas. Los oligosacáridos de hongos filamentosos son más parecidos a los de animales que a los de levaduras (Salovuori *et al.*, 1987), por lo que estos organismos son más interesantes para la expresión de proteínas con interés terapéutico (Archer & Peberdy, 1997, Kruszewska, 1999b). Se han observado algunos casos de hiperglicosilación que, sin embargo, no afectan a la función de la proteína, como por ejemplo en la expresión de *glaP* de *H. resinae*

(Joutsjoki *et al.*, 1993) o de una endopeptidasa de cebada (Nyysönen *et al.*, 1993) en *T. reesei*.

En el retículo endoplasmático, además de glicosilaciones, las proteínas sufren plegamientos que dan a lugar a la estructura terciaria adecuada para la función de la proteína. Este proceso está asistido por proteínas llamadas chaperonas y “foldasas”. Uno de las reacciones más importantes que se dan es el de la formación de puentes disulfuro, que corre a cargo de la enzima PDI (“protein disulfide isomerase”). El gen que codifica esta enzima ha sido clonado en *T. reesei* (Saloheimo *et al.*, 1999). La regulación del gen *pdil* es muy similar a la conocida para muchas enzimas extracelulares de *T. reesei*, sobre todo celulasas: reprimible por glucosa e inducible en presencia de celulosa. Además, la expresión del gen aumenta cuando el hongo es tratado con agentes como el DTT y la tunicamicina, que dispara la respuesta a proteínas no plegadas o UPR (“unfolded protein response”). El mismo comportamiento se ha observado con la proteína BiP en *Aspergillus awamori*, una chaperona miembro de la clase 70 de proteínas inducibles por estrés (Hijarrubia *et al.*, 1997).

Además de éstas, otras muchas actividades son detectadas en el retículo y las vesículas de transporte. Así, se han clonado algunos genes homólogos a los SAR de *S. cerevisiae* en *T. reesei* y *A. niger* (Veldhuisen *et al.*, 1997). Se ha constatado asimismo la influencia de la homeostasis de Ca^{2+} en el transporte intracelular de xilanasas (Mach *et al.*, 1998). Mediante mutagénesis clásica, se han obtenido algunos mutantes de transporte, como es el caso de RutC30 de *T. reesei* (Glenn *et al.*, 1985) y PF1 de *T. harzianum* (Rey *et al.*, 2001). Estas cepas suelen tener fenotipos muy pleiotrópicos, lo que dificulta su caracterización. Sin embargo, son cepas muy interesantes para la producción de proteínas. Toda la información que poseemos hoy día es aún insuficiente para conocer cómo funciona el sistema de transporte, que parece ser el cuello de botella de la producción de proteínas en hongos filamentosos (Peberdy, 1994).

Introducción: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

Una vez que las proteínas han sido secretadas, pueden sufrir proteólisis en el medio extracelular (Archer *et al.*, 1992, Kusters-van Someren *et al.*, 1992, Punt *et al.*, 1991, Margolles-Clark *et al.*, 1996, por dar sólo algunos ejemplos). Para hacer frente a este problema se han obtenido y caracterizado mutantes que tienen menos actividad proteasa (Berka *et al.*, 1990, Van den Hombergh *et al.*, 1997a y b) que en algunos casos han demostrado su utilidad en la producción de proteínas (Dunn-Coleman *et al.*, 1991, Moralejo *et al.*, 2000).

En este trabajo se ha llevado a cabo la superproducción de la enzima BGN16.2 usando el promotor de la piruvato quinasa de *T. reesei* (Mach *et al.*, 1994), ya que lo que se pretende es, no sólo la obtención de cepas con mayor capacidad antifúngica (que frente a un patógeno secreten cantidades más altas de enzimas hidrolíticos) sino también un sistema que permita producir de manera rápida BGN16.2 con un nivel de pureza aceptable. Esta β -1,6-gluconasa podría tener aplicaciones no sólo en el tratamiento de infecciones fúngicas en productos vegetales (como sería el control durante la postcosecha), y en clínica, en el tratamiento tópico de enfermedades fúngicas, sino que esta misma enzima u otras similares tienen una indudable utilidad en el estudio de la estructura de la pared celular (Kapteyn *et al.*, 1996, Kollár *et al.*, 1997), en la clarificación de mostos y aromatización de vinos (Dubordieu *et al.*, 1985) o como aditivo alimentario para los piensos (Brenes *et al.*, 1993).

RESULTADOS

1. Obtención de cepas derivadas de *T. harzianum* CECT 2413 que producen niveles más altos de β -1,6-glucanasa II

Para obtener cepas de *T. harzianum* que sobreexpresaran β -1,6-glucanasa II se utilizaron los vectores pLMRS3::*bgn16.2* y p3SR2 (Fig. 1). Se recurrió a la cotransformación por ser el sistema más simple y de probada eficacia en la cepa *T. harzianum* CECT 2413 (Limón *et al.*, 1999). En el primer vector, el cDNA completo que codifica para la BGN16.2 se encuentra bajo el control del promotor de la piruvato quinasa (*pki*) y del terminador de la celobiohidrolasa II (*cbh2*), de *T. reesei* (Mach *et al.*, 1994). El marcador de selección, el gen *amdS*, está en el vector p3SR2, y confiere la capacidad de usar acetamida como única fuente de nitrógeno (Kelly & Hynes, 1985).

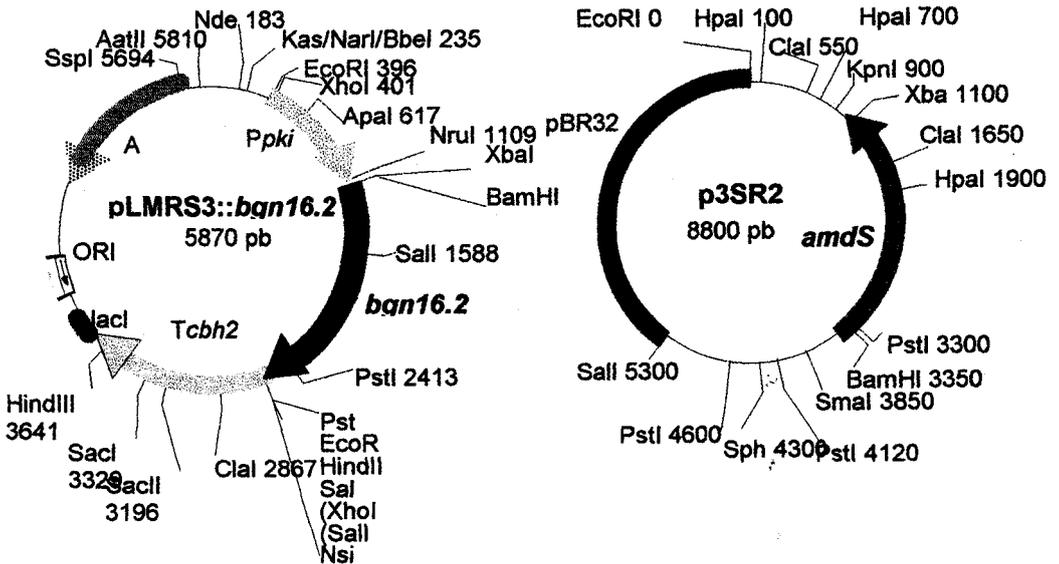


Fig. 1: Mapas de los plásmidos pLMRS3::*bgn16.2* y p3SR2.

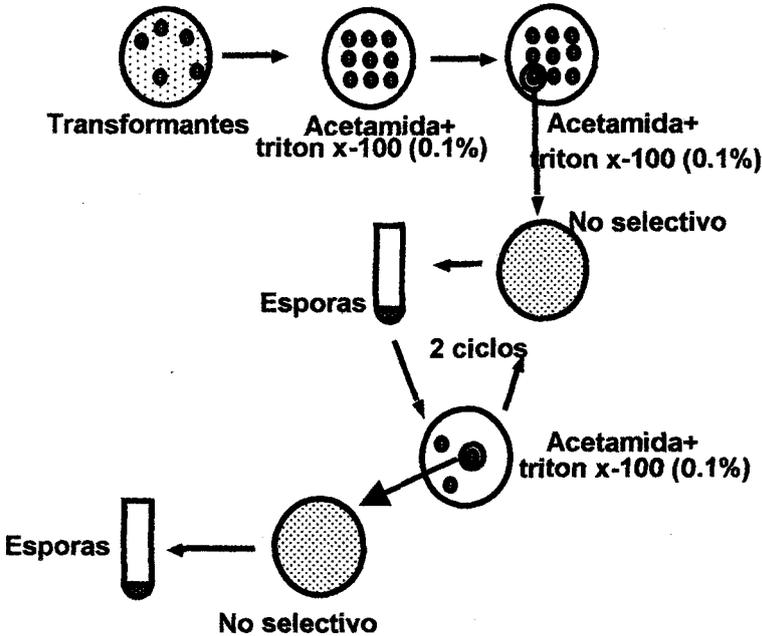


Fig. 2: Esquema del proceso llevado a cabo para obtener transformantes estables para el carácter $amdS^+$.

La transformación de protoplastos se realizó con el método de PEG- $CaCl_2$ (Penttilä *et al.*, 1987) y se obtuvo una frecuencia de transformación de alrededor de 600 transformantes/ μg de ADN. Se tomaron 30 colonias y se sometieron al proceso de estabilización descrito en la figura 2. Finalmente, se seleccionaron aquellos transformantes que tenían la misma frecuencia de esporas transformadas en medio selectivo y no selectivo. Para comprobar la presencia del carácter deseado, esto es, expresión de la proteína BGN16.2 en medios con glucosa, los micelios de los transformantes estables se cultivaron en cajas de MM con glucosa y pustulan (un polímero de β -1,6-glucano). El pustulan no hidrolizado se precipitó con etanol, pudiéndose observar halos de hidrólisis alrededor de las cepas transformadas (Fig 3). Las cepas B4, B6, B7, B8 y B12 se seleccionaron para analizarlas más detalladamente.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

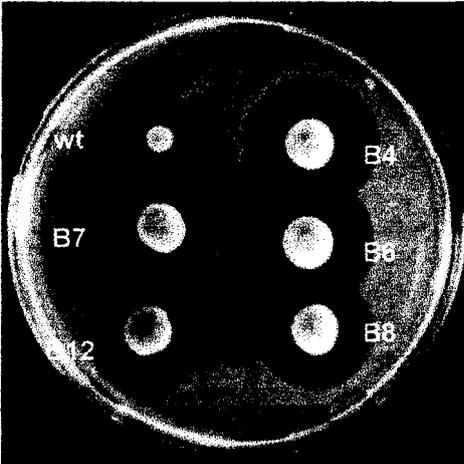


Fig. 3: Halos de actividad β -1,6-glucanasa producidos en medio mínimo (MM) suplementado con 2% glucosa y 0,05% pustulan por *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y las cepas transformadas para la expresión constitutiva de *bgn16.2* (B4-B12).

El número de copias de *bgn16.2* insertadas en el genomio de *T. harzianum* se estudió mediante experimentos de Southern. En la figura 4A se observa en los transformantes una banda intensa de unas 2,3 kb que corresponde a los fragmentos que incluyen promotor de *pki* más el gen *bgn16.2*, liberados por corte con una diana *EcoRI*. Se observan fragmentos de otros tamaños, que podrían deberse a integraciones no deseadas, por lo que, para la cuantificación del número de copias, se tuvo en cuenta sólo la banda de 2,3 kb. Así, midiendo intensidad de dichas bandas y relativizando con la banda del gen original, se obtuvo un número aproximado de copias de 4 para B4 y B6, 2 para B7 y B8 y de 5 para B12.

El modo de integración del vector en el genomio se estudió también mediante experimentos de Southern. Para ello, el ADN genómico se cortó con *XbaI*, que corta una sola vez en el vector. En la figura 4B, se observa una banda intensa de aproximadamente 6 kb, que es el tamaño del vector. Esto indica la existencia de integraciones en tándem. Las otras bandas presentes en las cepas B4 y B6 pueden deberse a otras integraciones y a los extremos del tándem. En las

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

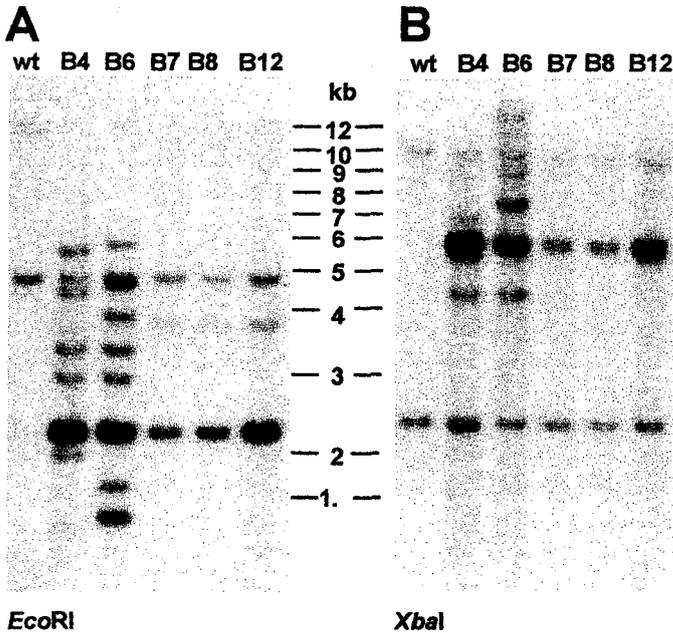


Fig. 4: Southern-blot realizado sobre ADN de *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y las cepas transformadas para la expresión constitutiva de *bgn16.2* (B4-B12). El ADN se cortó con las enzimas indicadas. Se usó como sonda el ADNc completo de *bgn16.2*.

figuras 4A y B se observan otra banda clara coincidente en las cepas transformadas y la cepa silvestre, lo cual se debe a la existencia de algún gen que presenta similitud a *bgn16.2* (Lora *et al.*, 1995).

También se analizó la existencia del gen *amdS* en el genomio de *T. harzianum* (Fig. 5). Para ello, el ADN se cortó con *EcoRI* y se hibridó con el gen completo, observándose la presencia de copias dispersas y en tándem en las cepas transformadas, así como la ausencia de señal en la cepa silvestre.

Para comprobar si el gen *bgn16.2* se expresaba correctamente se realizó un experimento de Northern-blot, utilizando ARN extraído de micelios que crecieron usando glucosa o quitina como única fuente de carbono (Fig 6). En las cepas

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

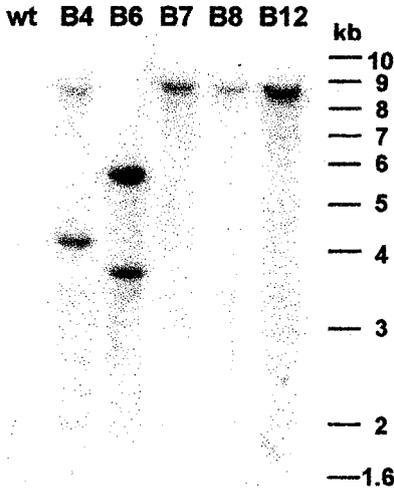


Fig. 5: Southern-blot realizado sobre ADN genómico de las cepas indicadas cortado con *EcoRI*. Se usó como sonda el fragmento *XbaI-SalI* que contiene el gen *amdS*.

EcoRI

transformadas el promotor se expresaba en ambas condiciones, produciendo cantidades de ARNm de *bgn16.2* prácticamente idénticas cuando el hongo crecía con glucosa o con quitina. Los transformantes B7 y B8 tenían un nivel de expresión muy similar, como cabría esperar dado su patrón de integración. Lo mismo les ocurría a los transformantes B4 y B6. La expresión en la cepa silvestre sólo era detectable en quitina, y a un nivel muy inferior al obtenido para las cepas transformadas. Se observó además la existencia de una doble señal en las cepas transgénicas, debido probablemente a la existencia de dos señales de poliadenilación del ARNm: una en la secuencia de *bgn16.2* y otra en el vector, perteneciente al terminador de la celobiohidrolasa II.

Se realizaron medidas de actividad β -1,6-glucanasa en los sobrenadantes de los cultivos anteriormente descritos (Fig 7). En los cultivos con quitina como fuente de carbono la actividad β -1,6-glucanasa detectada en los transformantes es

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

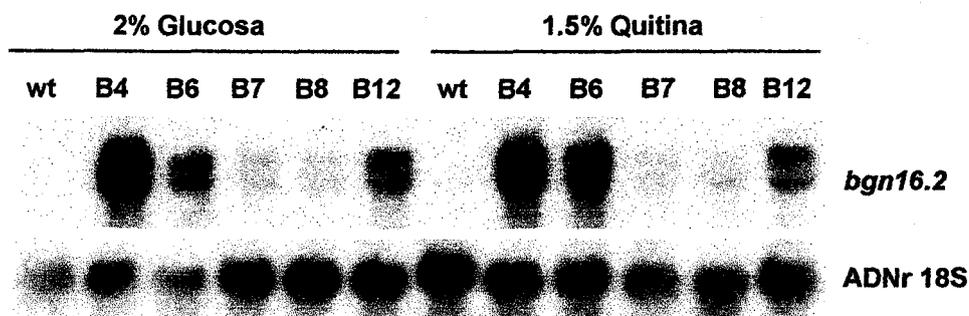


Fig. 6: Northern-blot realizado sobre ARN total extraído de los micelios crecidos durante 24 horas en medio mínimo (MM) con 2% glucosa o 1,5% quitina como fuente de carbono de las cepas *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y las transformadas para la expresión constitutiva de *bgn16.2* (B4, B6, B7, B8 y B12). Previamente los micelios se cultivaron durante 40 horas en MM con 2% glucosa. En el panel de arriba se usó como sonda el ADNc completo del gen *bgn16.2* y en el de abajo el ARN 18S de rábano, usado como control de carga.

entre 5 y 20 veces mayor que la obtenida en la cepa silvestre. Sorprendentemente, no se detectó actividad en los sobrenadantes provenientes de cultivos con glucosa; ni en la cepa silvestre ni en las cepas transformadas. Con el fin de comprobar si la falta de actividad se debía a que la proteína estuviera modificada de manera que impidiese su correcto funcionamiento se realizaron inmunodetecciones, usando anticuerpos anti-BGN16.2 con dichos sobrenadantes (Fig. 8). En los sobrenadantes de quitina se detectó una considerable cantidad de proteína en las cepas transformadas y en la cepa silvestre; pero en los sobrenadantes de glucosa no se detectó proteína.

Finalmente se midieron otras hidrolasas en los mismos sobrenadantes para comprobar si, como se ha descrito por otros autores (Rincón & Benítez, 2000, Limón, 1999), las cepas transformadas producen mayores cantidades de otras actividades enzimáticas. Las cepas transformadas obtenidas en este trabajo, creciendo en medios con glucosa o quitina como fuente de carbono, no producen actividades proteasa, quitinasa ni β -1,3-glucanasa más altas que la cepa silvestre (Tabla 1.3).

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

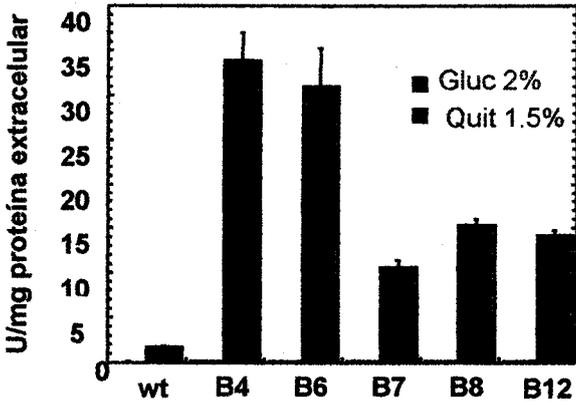


Fig. 7: Actividad β -1,6-glucanasa medida en los sobrenadantes de cultivos en MM con 2% glucosa o 1,5% quitina como fuente de carbono donde crecieron durante 24 horas las cepas *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y las transformadas para la expresión constitutiva de *bgn16.2* (B4, B6, B7, B8 y B12). Previamente se cultivaron durante 40 horas en MM con 2% glucosa.

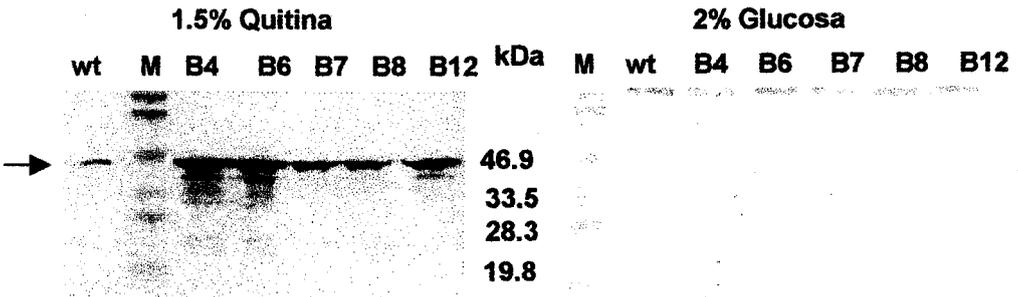


Fig. 8: Inmunodetección realizada sobre sobrenadantes de cultivos en MM con 2% glucosa o 1,5% quitina como fuente de carbono donde se cultivaron durante 24 horas las cepas *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y las transformadas para la expresión constitutiva de *bgn16.2* (B4, B6, B7, B8 y B12). Previamente se cultivaron durante 40 horas en MM con 2% glucosa. Se usó como anticuerpo un anti-BGN16.2 policlonal de conejo. La flecha indica la proteína BGN16.2. M: marcador de peso molecular.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

TABLA 1.3. Actividades proteasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa medidas en las cepas silvestre y transformadas para la expresión constitutiva de *bgn16.2* cultivadas en medio con glucosa o quitina.

Cepa	GLUCOSA			QUITINA		
	Proteasa (mU/g)	β -1,3-Glucanasa (mU/g)	Quitinasa	Proteasa (U/g)	β -1,3-Glucanasa (mU/g)	Quitinasa (mU/g)
wt	10,4 \pm 2,1	0,4 \pm 0,1	nd	15,4 \pm 3,1	67,1 \pm 7,60	71,9 \pm 18,8
amdS+	9,90 \pm 3,1	0,4 \pm 0,0	nd	15,7 \pm 2,6	65,3 \pm 15,1	75,7 \pm 22,8
B4	10,9 \pm 2,6	0,5 \pm 0,0	nd	11,8 \pm 1,9	56,3 \pm 3,67	57,4 \pm 11,8
B8	10,0 \pm 2,7	0,4 \pm 0,0	nd	15,3 \pm 2,3	70,2 \pm 7,73	75,0 \pm 20,8
B12	10,2 \pm 1,8	0,4 \pm 0,1	nd	11,8 \pm 2,1	60,4 \pm 7,82	55,8 \pm 12,7

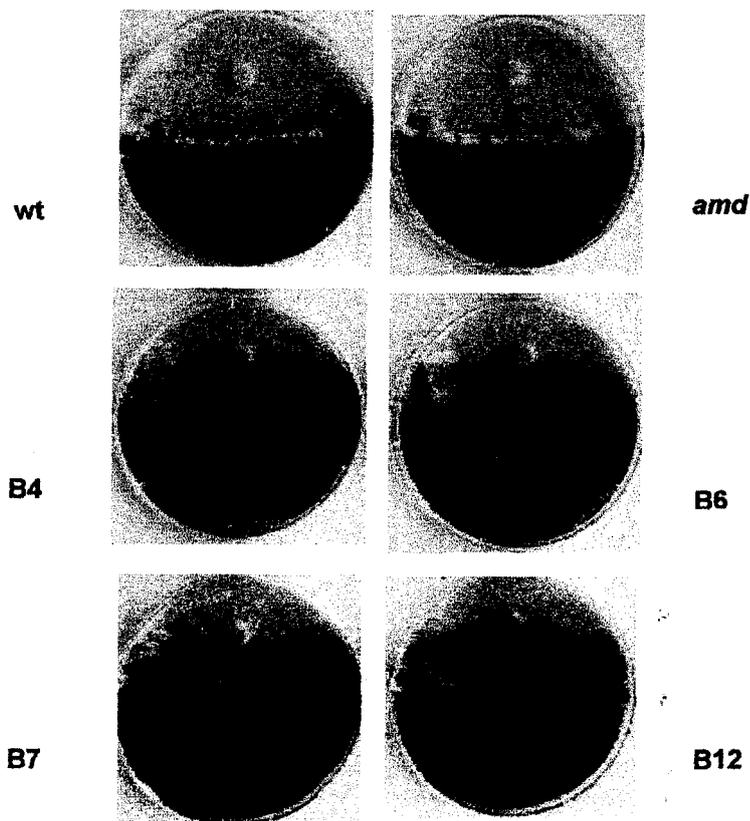


Fig. 9: Ensayo de confrontación de distintas cepas de *T. harzianum* (CECT 2413 -wt-, CECT 2413 transformada con p3SR2 -amdS-, y las transformadas para la sobreexpresión constitutiva de *bgn16.2* -B4, B6, B7 y B12-) sobre *R. solani*.

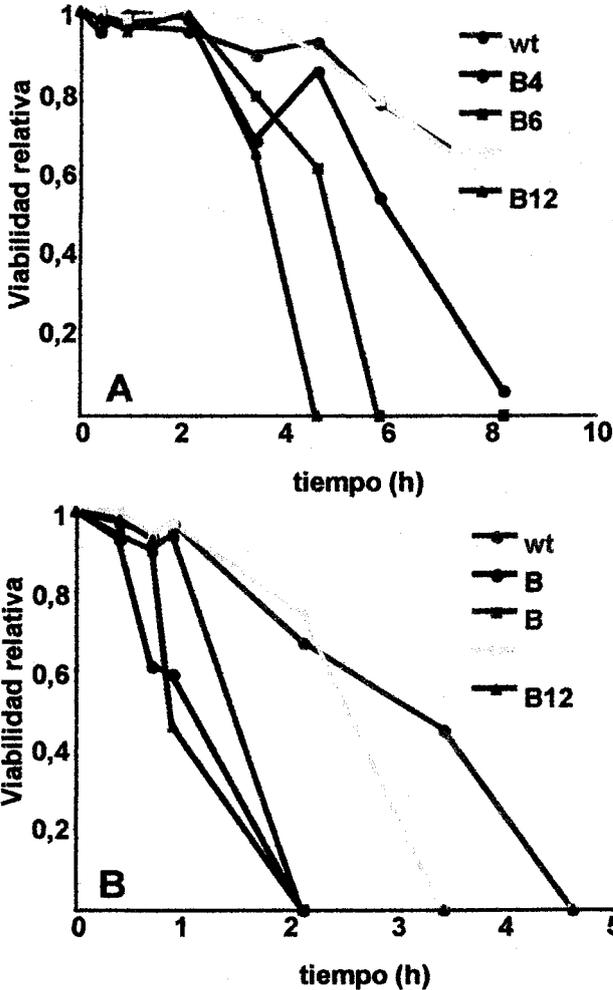


Fig. 10. Ensayo de capacidad antifúngica de la cepa *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y de las cepas transformadas para la expresión constitutiva del gen *bgn16.2* (B4-B12). Brevemente, los micelios de *T. harzianum* y *R. solani* son cultivados juntos en medio mínimo (MM) con 10% glucosa (A) o 0,1% glucosa (B) como fuente de carbono. Periódicamente, se sacan muestras y se cultivan en un medio nutritivo que no permite crecer a *Trichoderma* (PPG+ 5 mg/ml de benlate®). Se mide el radio de crecimiento de *R. solani*, anotándose la viabilidad relativa referida al crecimiento obtenido de muestras de un cultivo de *R. solani* en solitario.

2. Las cepas que sobreproducen la proteína BGN16.2 son mejores agentes antifúngicos contra *Rhizoctonia solani* que la cepa silvestre

Una finalidad de la sobreproducción de BGN16.2 es la de obtener cepas de *T. harzianum* que sean mejores antagonistas de hongos fitopatógenos. Esta capacidad se analizó de dos maneras. En primer lugar se realizaron ensayos de confrontación con *R. solani* en cajas (Limón *et al.*, 1999). Como se observa en la figura 9 las cepas transformadas eran capaces de crecer sobre el hongo fitopatógeno, esporulando sobre él. La muerte de *R. solani* se comprobó aislando las zonas de solapamiento y cultivando el hongo en un medio selectivo para el patógeno.

Por otro lado, la capacidad antagonista de las nuevas cepas se ensayó en cultivos líquidos (Fig. 10). Una vez crecidos los micelios de *T. harzianum* y de *R. solani*, se llevaron a cabo experimentos de cocultivo de las dos cepas en una relación 1:1 (peso húmedo), tanto en condiciones de alta (10%) como de baja concentración de glucosa (0,1%). En el primer caso, la muerte del patógeno se produce primero en los cultivos con la cepa B12, que posee un nivel medio de producción de β -1,6-glucanasa. A continuación, en los cultivos con las cepas B6 y B4, que producen mayores cantidades de enzima. Finalmente, la cepa B7, con los niveles más bajos tiene un comportamiento muy similar al silvestre. De manera parecida ocurre cuando el cultivo tienen poca glucosa (0,1%). La muerte de *R. solani* se da primero en los cultivos con las cepas B4, B6 y B12. Mientras que la cepa que produce niveles más bajos sólo provoca la muerte del patógeno 14 horas más tarde que las otras cepas transformadas, aunque sí lo hace antes que el silvestre.

3. La falta de proteína BGN16.2 en los sobrenadantes de las cepas transformadas correlaciona con la presencia de glucosa en el medio de cultivo

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

Dado que en las cepas transformadas la proteína BGN16.2 no se detectaba en medios con glucosa, se verificó si ese efecto se producía también combinando

TABLA 1.4. Actividad extracelular β -(1,6)-glucanasa específica (U/mg peso seco del micelio) medida en los sobrenadantes de las cepas *T. harzianum* CECT 2413 y la transformada B4, cultivadas en medio mínimo (MM) con diferentes fuentes de carbono (A) nitrógeno (B) o tamponado a diferentes pHs (C).

A)				proteasas
Fuente de carbono	wt	B4	pH final	ácidas
2 % glucosa	<0.1 ^a	<0.1	2.5	+ ^b
0.1 % glucosa	0.3	8.4	5.5	-
1.5 % quitina	1.1	12.8	5.5	-
1.5 % quitina+2 % glucosa	<0.1	<0.1	2.5	+
0.75 % pustulan	0.2	1.1	3.0	+
0.75 % pustulan+2 % glucosa	<0.1	<0.1	2.5	+
2 % glicerol	<0.1	<0.1	2.7	+
2 % arabinosa	<0.1	<0.1	2.7	+
2 % xilosa	<0.1	0.3	3.1	+
2 % citrato	<0.1	0.7	7.5	-
2 % lactosa	0.7	1.1	3.3	+
(0.5 % sulfato amónico como fuente de nitrógeno)				
B)				proteasas
Fuente de nitrógeno	wt	B4	pH final	ácidas
0.5 % sulfato amónico	<0.1	<0.1	2.5	+
1 % extracto de levadura	<0.1	36.2	4.1	+
1 % peptona	<0.1	14.3	4.3	+
1 % caseína	<0.1	6.3	4.2	+
0.52 % prolina	<0.1	1.2	5.3	-
0.5 % urea	<0.1	6.0	5.3	-
(2 % glucosa como fuente de carbono)				
C)				proteasas
pH	wt	B4	pH final	ácidas
3	<0.1	<0.1	2.9	+
6	<0.1	18.9	5.9	-
8	<0.1	11.9	7.5	-

(2 % glucosa and 0.5 % sulfato amónico como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente)

^a Los valores representan la media de tres experimentos. Las desviaciones estándar oscilaron entre 0 % (B4 en glicerol) y 26% (B4 en xilosa)

^b +, presencia of proteasas ácidas; -, ausencia.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

glucosa con otras fuentes de carbono. Se cultivaron las cepas silvestre y transformadas en medios con alta y baja cantidad de glucosa, así como en medios con quitina o pustulan solos y en combinación con altas concentraciones de glucosa. Los experimentos se realizaron con cada una de las cinco cepas transformadas y los resultados obtenidos fueron idénticos, de manera que se presentan sólo aquellos relativos a la cepa B4, que mostraba los niveles de actividad más altos.

La cepa B4 presentaba unos niveles de ARNm altos y muy similares entre sí en todas las condiciones de cultivo señaladas (Fig 11). Sin embargo, la actividad era sólo detectable en condiciones de hambre de carbono, usando quitina como única fuente de carbono, o en los medios con pustulan (en unos niveles muy bajos) (Tabla 1.4). Cuando las distintas cepas de *T. harzianum* crecían usando glucosa como fuente de carbono (sola, o combinada con quitina o pustulan) no se detectaba

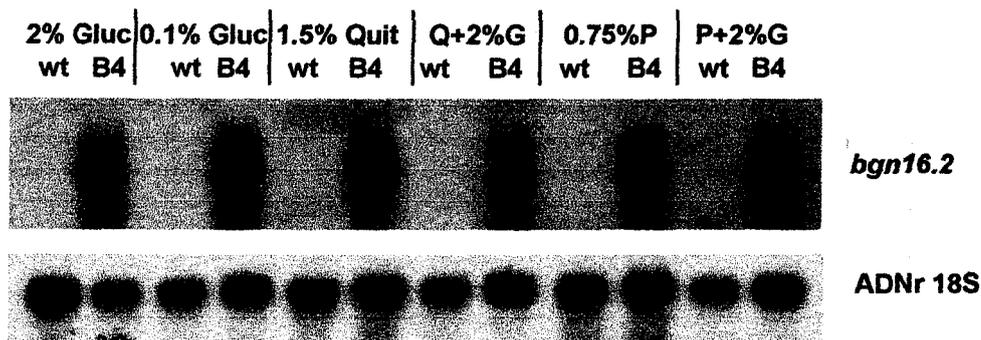


Fig. 11: Northern-blot realizado sobreARN total extraído de las cepas CECT 2413 (wt) y transformada para la expresión constitutiva del gen *bgn16.2* (B4). Los micelios se cultivaron durante 24 horas en MM con las siguientes fuentes de carbono: 2% glucosa (2%Gluc), 0,1% glucosa (0,1% Gluc), 1,5% quitina (1,5% quit), 1,5% quitina más 2% glucosa (Q+1%G), 0,75% pustulan (0,75%P) y 0,75% pustulan más 2% glucosa (P+2%G). Previamente los micelios se habían cultivado durante 40 horas en MM con 2% glucosa como fuente de carbono. En el panel de arriba se usó el ADNc completo de *bgn16.2* como sonda, y en el de abajo se usó el ADNr 18S de rábano como control de carga.

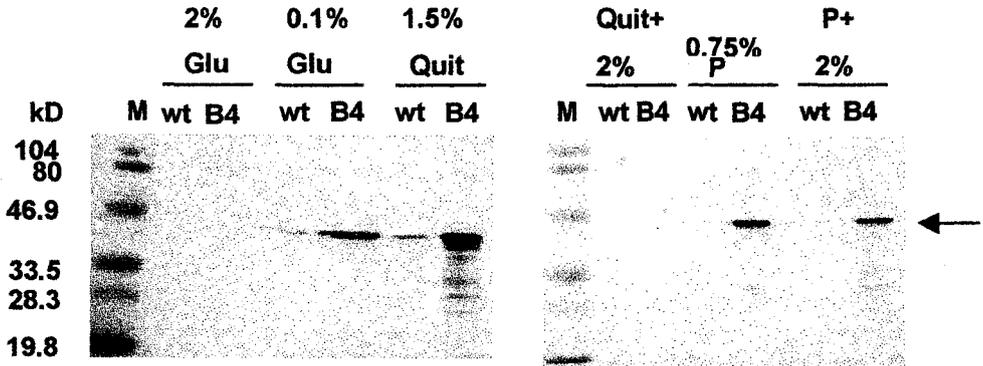


Fig. 12: Inmunodetección realizada sobre proteína extracelular concentrada de sobrenadantes de las cepas CECT 2413 (wt) y transformada para la expresión constitutiva del gen *bgn16.2* (B4). Los micelios se cultivaron durante 24 horas en MM con las siguientes fuentes de carbono: 2% glucosa (2%Glu), 0,1% glucosa (0,1% Gluc), 1,5% quitina (1,5% Quit), 1,5% quitina más 2% glucosa (Q+1%G), 0,75% pustulan (0,75%P) y 0,75% pustulan más 2% glucosa (P+2%G). Previamente los micelios se habían cultivado durante 40 horas en MM con 2% glucosa como fuente de carbono. Se usó anti-BGN16.2 policlonal de conejo. La flecha indica la proteína BGN16.2. M: marcador de peso molecular.

actividad β -1,6-glucanasa (Tabla 1.4). Estos resultados fueron corroborados por la ausencia de proteína BGN16.2 detectada en experimentos de western-blot con dichos sobrenadantes, salvo en los sobrenadantes que provenían de un cultivo con pustulan y glucosa como fuentes de carbono (Fig. 12). En este último caso se detectaba señal correspondiente a BGN16.2, que presentaba, asimismo, señales de degradación.

4. La proteína BGN16.2 es detectable intracelularmente aún cuando no exista en el sobrenadante

Con el fin de comprobar si la degradación de la proteína se produce fuera de la célula o dentro de ella, se realizaron inmunodetecciones sobre extractos celulares totales (Fig. 14) usando micelios crecidos en las condiciones descritas

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

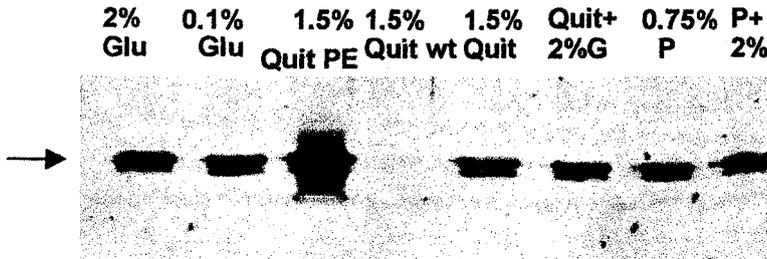


Fig. 13: Inmunodetección de la proteína BGN16.2 realizada sobre concentrados de proteínas totales extraídas de micelio de la cepa transformada B4 crecida durante 24 horas en las siguientes condiciones: MM con 2% glucosa (2%Glu), MM con 0,1% glucosa (0,1%Glu), MM con 1,5% quitina (1,5% Quit), MM con 1,5% quitina más 2% glucosa (Quit+2%G), MM con 0,75% pustulan (0,75%P) y MM con 0,75% pustulan más 2% glucosa (P+2%G). También se incluyeron: concentrado de proteínas totales extraídas de micelio de la cepa silvestre CECT 2413 crecida en MM con 1,5% quitina (1,5% Quit wt) y concentrado de un sobrenadante de un cultivo de la cepa transformada B4 crecida en 1,5% quitina (1,5% Quit PE). Las proteínas se separaron en un gel de 12 cm y con 7,5% de acrilamida. Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-BGN16.2 obtenidos de conejo. La flecha indica la proteína BGN16.2.

anteriormente. En dichos experimentos se detectó la presencia de BGN16.2 en todos los extractos correspondientes a la cepa transformada B4 (nunca en la cepa silvestre), tanto en los pertenecientes a condiciones de cultivo donde la proteína extracelular es detectable como en aquellos sobrenadantes en los cuales no lo es. Dichos extractos fueron también separados en un gel de poliacrilamida al 7.5 % y sometidos después a inmunodetección (Fig 13). Se observó que el tamaño de la proteína intracelular y extracelular era el mismo. Se descartó, por tanto, la proteólisis intracelular o modificaciones que afectaran significativamente al tamaño de la proteína, tales como glicosilaciones o falta de procesamiento del péptido señal, como causantes de la falta de proteína en el sobrenadante.

Dado que existía la posibilidad de que las proteínas estuvieran glicosiladas con pequeños residuos que, de alguna manera, impidieran su correcto plegamiento y transporte, los extractos fueron eluidos a través de columnas de concanavalina A,

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

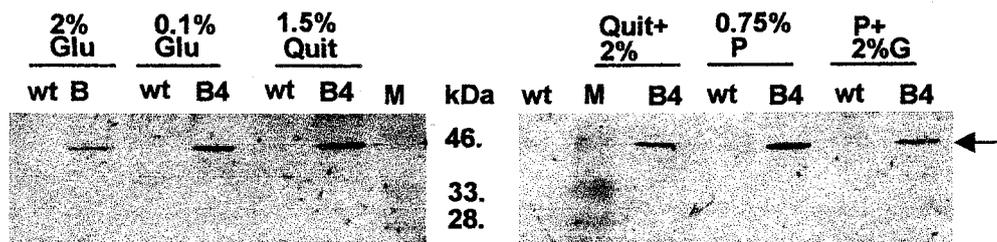


Fig. 14: Inmunodetección realizada sobre proteína total extraída de micelio de las cepas CECT 2413 (wt) y transformada para la expresión constitutiva del gen *bgn16.2* (B4). Los micelios se cultivaron durante 24 horas en MM con las siguientes fuentes de carbono: 2% glucosa (2%Glu), 0,1% glucosa (0,1% Gluc), 1,5% quitina (1,5% Quit), 1,5% quitina más 2% glucosa (Q+2%G), 0,75% pustulan (0,75%P) y 0,75% pustulan más 2% glucosa (P+2%G). Previamente los micelios se habían cultivado durante 40 horas en MM con 2% glucosa como fuente de carbono. Se usó anti-BGN16.2 policlonal de conejo. La flecha indica la proteína BGN16.2. M: marcador de peso molecular.

que tiene la capacidad de unir residuos individuales de azúcares (Fig. 15). Sin embargo, en ningún caso la proteína BGN16.2 producida por la cepa B4 (proveniente de extractos de micelio o de sobrenadantes del cultivo) fue retenida por la lectina, por lo que se descartaron también las pequeñas glicosilaciones como causa de la ausencia de proteína BGN16.2 en sobrenadantes con glucosa.

5. Medio de cultivo con fuentes orgánicas de nitrógeno o con pHs no ácidos dan lugar a niveles de BGN16.2 extracelular muy altos en las cepas transformadas

Puesto que se conocía que el ARNm se producía correctamente, que la proteína era sintetizada y que, intracelularmente, era detectable siempre, se procedió a investigar la influencia de la proteólisis extracelular como principal responsable de la ausencia de BGN16.2 en algunos de los medios de cultivo

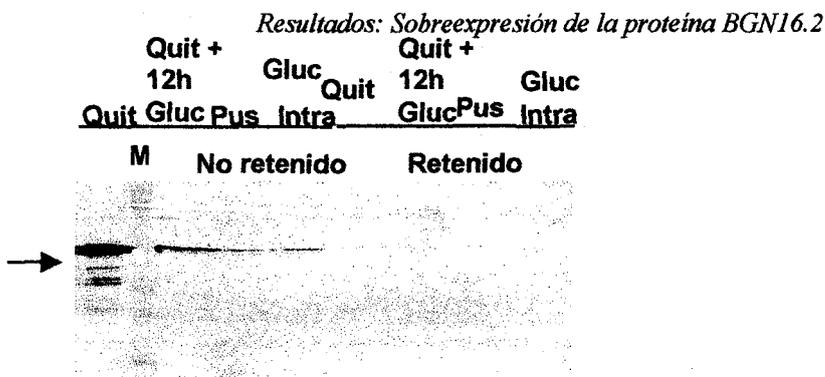


Fig. 15: Inmunodetección de la proteína BGN16.2 usando anticuerpos policlonales de conejo para BGN16.2. El experimento se realizó eluyendo los distintos concentrados de proteínas a través de columnas de concanavalina A-sefarosa. Se indica como “no retenido” lo que no se pegó a la resina; mientras que “retenido” se refiere a la fracción que, habiéndose pegado a la resina por estar glicosilada, hubo de ser separada eluyendo con metil- α -D-manopiranosido. Se usaron los siguientes concentrados: sobrenadante de un cultivo de la cepa transformada B4 crecida durante 24 h en MM con 1,5% quitina como fuente de carbono (Quit); sobrenadante de un cultivo de la cepa transformada B4 crecida en MM con 1,5% quitina como fuente de carbono durante 24 h seguido de la adición de 2% glucosa al cultivo y continuando la incubación 12 horas (Quit+12 h Gluc); sobrenadante de un cultivo de la cepa transformada B4 crecida en MM con 0,75% pustulan como fuente de carbono (Pus); extracto total de proteínas del micelio de la cepa transformada B4 crecida durante 24 h en MM con 2% glucosa como fuente de carbono (Gluc Intra). En todos los casos los micelios se cultivaron previamente en MM con 2% glucosa. La flecha indica la proteína BGN16.2. M: marcador de peso molecular.

ensayados. Para ello, se realizaron experimentos en los que se modificó la fuente de carbono, de nitrógeno o el pH del cultivo –descritos como principales reguladores de las proteasas extracelulares en hongos (Jarai & Buxton, 1994)-. En todas las condiciones se midieron tanto la cantidad de ARNm como la actividad β -1,6-glucanasa, y se comprobó la presencia o no de proteasas. Los datos están resumidos en la Tabla 1.4. Para verificar que la actividad detectada se debía a la enzima BGN16.2 se realizaron experimentos de western-blot, así como detecciones de actividad en gel de isoelectroenfoque (IEF). La presencia de proteasas en el sobrenadante se estudió mediante ioelectroenfoque seguido de zimograma (detección de actividad proteasa por impresión del IEF sobre un gel de proteína BSA) de los sobrenadantes obtenidos en las condiciones de cultivo ensayadas.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

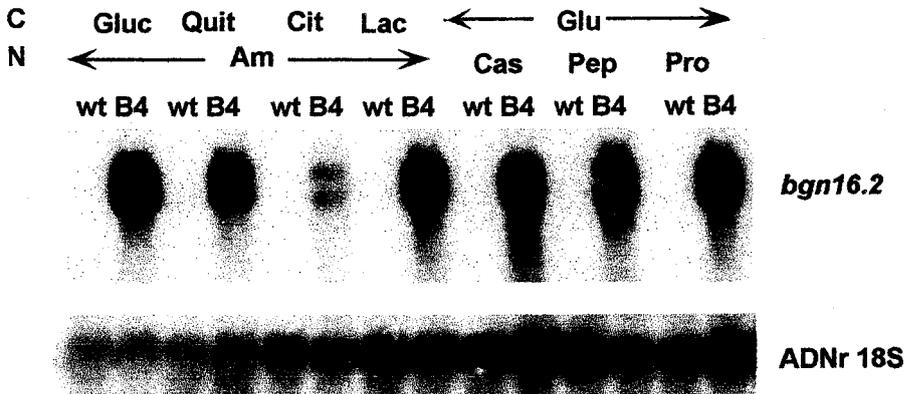


Fig. 16: Análisis por Northern-blot de ARN extraído de las cepas *T. harzianum* CECT2413 (wt) y la cepa transformada B4 (que sobreexpresa el gen *bgn16.2*). Los micelios se cultivaron en medio MM con 2% glucosa (Gluc), 1,5% quitina (Quit), 2% citrato (Cit) y 2% lactosa (Lac), y con 0,5% sulfato amónico como fuente de nitrógeno; o en MM con 1% caseína (Cas), 1% peptona (Pep) o 0,52% prolina (Pro), y con 2% glucosa como fuente de carbono. Como sonda se utilizó el ADNc completo del gen *bgn16.2* y el ADNr 18S de rábano como control de carga.

En primer lugar se utilizaron distintas fuentes de carbono. Se probaron glicerol, xilosa, arabinosa, lactosa y citrato (además de las antes mencionadas quitina y pustulan). Experimentos de northern-blot revelaron que el promotor utilizado (el de la piruvato quinasa de *T. reesei*) funcionaba correctamente en todas las condiciones salvo cuando se usaba citrato como única fuente de carbono (Fig. 16), condición en la que los niveles de ARNm de *bgn16.2* eran inferiores a lo obtenido con el resto de las fuentes de carbono utilizadas (datos no mostrados). En segundo lugar se utilizaron distintas fuentes de nitrógeno: bien orgánicas, como el extracto de levadura, la peptona, la caseína o la prolina, bien inorgánicas, como la urea. En todas ellas la expresión del promotor tenía los niveles esperados (Fig. 16). Y finalmente se modificó el pH. Para ello, cultivos de la cepa B4 con glucosa y sulfato amónico como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, se tamponaron con citrato (a pH 3), con MES-KOH (a pH 6) o con Tris-HCl (a pH 8).

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

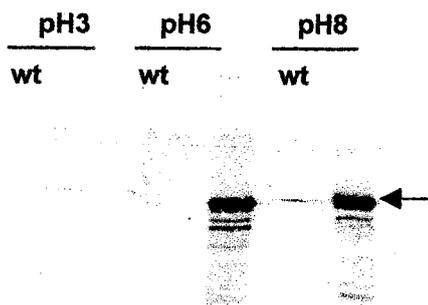


Fig. 17: Inmunodetección realizada sobre proteína extracelular concentrada de sobrenadantes de las cepas CECT 2413 (wt) y transformada para la expresión constitutiva del gen *bgn16.2* (B4). Los micelios se cultivaron durante 24 horas en MM tamponados a los siguientes pHs: pH3 (tampón citrato 0,2M); pH6 (tampón MES-KOH 0,2M) y pH8 (tampón Tris-HCl 0,2M). Previamente los micelios se habían cultivado durante 40 horas en MM sin tamponar. En todos los casos se usó 2% glucosa como fuente de carbono y 0,5% sulfato amónico como fuente de nitrógeno. Se usó anti-BGN16.2 policlonal de conejo. La flecha indica la proteína BGN16.2.

En todos los casos, la expresión de *bgn16.2* no difería significativamente de la obtenida en la mayoría de las condiciones probadas (datos no mostrados).

Los cambios de fuente de carbono no provocaban un aumento de la actividad, salvo en los casos ya señalados de hambre de carbono, quitina y pustulan (Tabla 1.4). Niveles muy bajos pero detectables de actividad se hallaron en medios con xilosa, citrato y lactosa. Cuando se alteró la fuente de nitrógeno se observó que el aumento de actividad β -1,6-glucanasa de la cepa B4 respecto a la cepa silvestre era muy significativo cuando se usaban extracto de levadura o peptona, y menores con el resto de las fuentes usadas (Tabla 1.4). Estos datos fueron corroborados mediante experimentos de western-blot (no mostrados). Finalmente, se constató que, sólo si se alteraba el pH del cultivo, se obtenían grandes cantidades de proteína BGN16.2 activa en la cepa transformadas B4 (cuando el pH era 6 u 8, pero no a pH 3) (Tabla 1.4 y Fig. 17).

Parecía entonces que en medios de cultivo con pH bajo (cercano a 3), bien inducido mediante un tampón bien por el propio metabolismo de *T. harzianum*, la actividad β -1,6-glucanasa II detectada era baja o nula.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

En cuanto a las proteasas se observan cuatro zonas de actividad lítica: dos de pH ácido, una a pH neutro y una a pH alcalino (Fig. 18). En el caso de las fuentes de carbono y el pH, la existencia de actividades proteasa ácidas correlaciona exactamente con la ausencia de proteína BGN16.2. Sin embargo, en el caso de la fuente de nitrógeno, se detecta β -1,6-glucanasa II incluso en aquellas condiciones en las que aparecen actividades proteasas ácidas. La actividad proteasa neutra y la básica se observan usando quitina como fuente de carbono o caseína como fuente de nitrógeno, además de en condiciones de baja concentración de

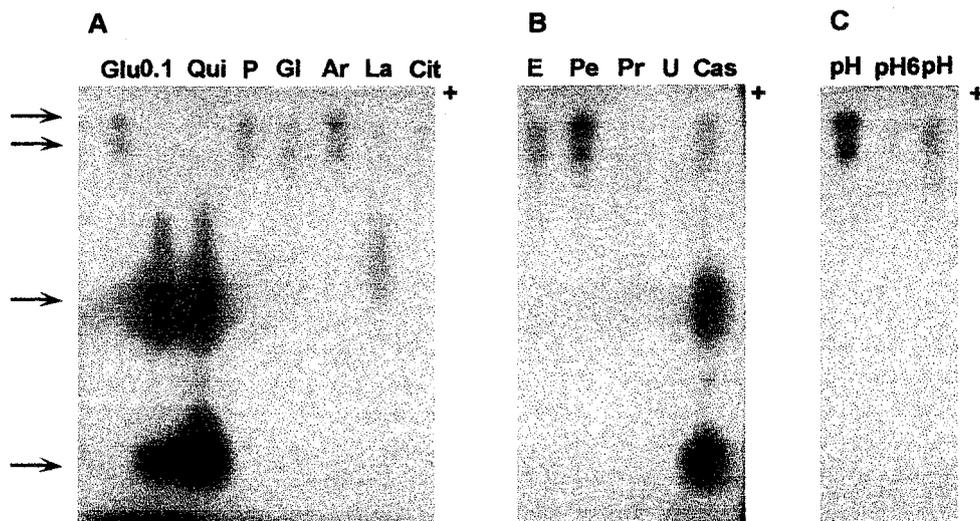


Fig. 18: Zimograma realizado sobre un isoelectroenfoque (pH 3,5-9,5) que revela halos de actividad proteasa. Se separaron proteínas extracelulares obtenidas de los sobrenadantes de los cultivos de la cepa transformada B4 crecida en diferentes condiciones de cultivo. Panel A: se usó como fuente de carbono 2% glucosa (Glu), 0,1% glucosa (0,1G), 1,5% quitina(Quit), 0,75% pustulan (P), 2% glicerol (Gli), 2% arabinosa (Ara), 2% lactosa (Lac) y 2% citrato (Cit). En todos los casos se utilizó 0,5% sulfato amónico como fuente de nitrógeno. Panel B: la fuente de nitrógeno utilizada fue: 1% extracto de levadura (EL), 1% peptona (Pep), 0,52% prolina (Pro), 0,5% urea (U) y 1% caseína (Cas). En todos los casos se añadió a los cultivos 2% glucosa como fuente de carbono. Panel C: se utilizaron sobrenadantes de cultivos tamponados a pH3 (tampón citrato), pH6 (MES-KOH) y pH8 (Tris-HCl). En los tres caso se usaron 2% glucosa y 0,5% sulfato amónico como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Las flechas indican los halos de actividad proteasa.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

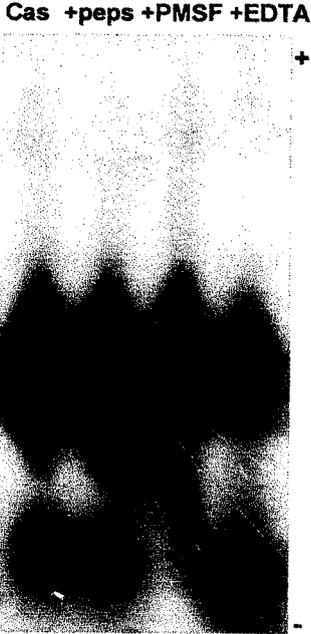


Fig. 19: Inhibición de las proteasas de *T. harzianum*. Se usaron sobrenadantes concentrados de cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 (wt) crecido durante 24 horas en MM con 1% de caseína como fuente de nitrógeno sin incubar con inhibidores (Cas) o tratado 30 min a 30°C con 1µM de pepstatina (+peps) o 0,1 mM de PMSF (+PMSF) o 0,5 µM EDTA (EDTA). El micelio creció previamente en MM con 2%glucosa y 0,5% de sulfato amónico. Posteriormente fueron separados mediante isoelectroenfoque (pH 3,5-9,5). La actividad proteasa fue revelada mediante un zimograma, realizado por impresión del gel de isoelectroenfoque sobre un gel de BSA (hecho en tampón acético-acetato a pH 5,5).

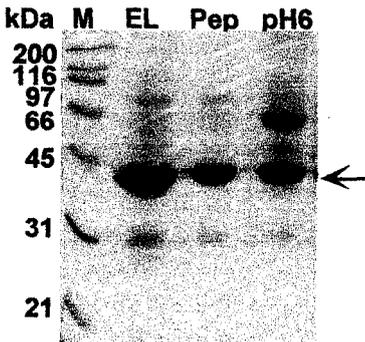


Fig. 20. Proteínas obtenidas por precipitación con sulfato amónico (ver Materiales y métodos) separadas en un gel de SDS-PAGE y teñidas con coomassie (Brilliant Blue R-250). Se cargaron aproximadamente 5 µg de proteína extracelular total. Las proteínas se obtuvieron de sobrenadantes de cultivos con 1% extracto de levadura (EL) o 1% peptona (Pep) como fuente de nitrógeno o bien cultivos tamponados a pH6 (MES-KOH). La flecha indica la proteína BGN16.2. M: marcador de peso molecular.

glucosa en el medio, y coexisten con altas actividades β-1,6-glucanasa.

Para comprobar de qué tipos de proteasas se trataban, se incubó un sobrenadante de un cultivo con caseína como fuente de nitrógeno –que contiene las cuatro actividades detectadas- con inhibidores de aspartil-proteasas (pepstatina), metaloproteasas (EDTA) y serin-proteasas (PMSF) y se sometieron a

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

isoelectroenfoco y zimograma (Fig. 19). Se observó que las proteasas ácidas eran inhibidas por pepstatina y EDTA, de lo que se dedujo que eran aspartil-proteasas. La proteasa alcalina se inhibió con PMSF, por lo que supuso que era una proteasa del tipo serín-proteasa. La proteasa neutra no se inhibió con ninguno de los tratamientos.

Los sobrenadantes obtenidos en las condiciones de cultivo en las que las actividades fueron más altas se separaron en un gel de SDS-PAGE y las proteínas se tiñeron con Coomassie (Fig. 20). Cuando se usa extracto de levadura como fuente de nitrógeno, BGN16.2 se producía prácticamente pura en la cepa transformadas B4. Midiendo la cantidad de proteína extracelular y el peso seco del micelio, se calculó que la cantidad de BGN16.2 producida era 1-5% del peso seco del micelio para la cepa transformada B4 (Tabla 1.5).

TABLA 1.5. Producción de proteína BGN16.2 en la cepa B4

Medio ^a	Actividad β -1,6-glucanasa (U/mg)	Proteína Extracelular (mg/l cultivo)	Proteína Extracelular (mg/g micelio)
EL	223	15	43
Pep	55	6	16
pH 6	56	16	33

^a MM con 2 % glucosa como fuente de carbono y 1 % extracto de levadura (EL) o 1 % peptona (Pep) como fuente de nitrógeno o MM con 2 % glucosa and 0,5 % amonio, tamponado a pH 6 (pH6). PE= proteínas extracelulares. Unidad se define como para la Tabla 1.

6. Aspartil-proteasas y un pH ácido son responsables de la degradación de BGN16.2

Para verificar la influencia del pH y las proteasas en la estabilidad de la BGN16.2 se llevó a cabo un ensayo de proteólisis in vitro. En dicho ensayo, se mezclaron e incubaron BGN16.2 purificada con sobrenadantes que contenían dichas actividades proteasas y que habían sido hervidos, dializados o tratados con inhibidores de proteasas (Fig. 21). La proteína BGN16.2 es muy inestable puesto

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

que sólo en un tampón a pH 7 no se degrada. En tampones a pH 5.5 o 2.7 se produce una degradación parcial de la proteína. El tratamiento de la proteína con el sobrenadante de la cepa B4 de *T. harzianum* cultivado en glucosa (que contiene proteasas ácidas) da lugar a una degradación casi completa de la proteína. Esa degradación se palía parcialmente bien hirviendo el sobrenadante previamente o bien dializándolo en tampón acetato a pH 5.5. El tratamiento con inhibidores de proteasas revela que sólo el inhibidor de aspartil-proteasas (pepstatina) es capaz de evitar la degradación de la BGN16.2.

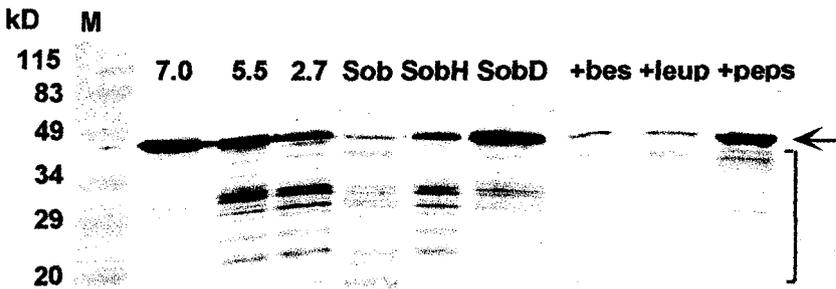


Fig. 21: Ensayo de proteólisis *in vitro*. 0,5 µg de BGN16.2 fueron sometidos a inmunodetección tras ser incubados durante 8 horas a 22°C en las siguientes condiciones: BGN16.2 en 50 mM tampón citrato a pH 7 (7,0); BGN16.2 en 50 mM tampón acetato a pH 5,5 (5,5); BGN16.2 en 50 mM tampón citrato a pH 2,7 (2,7); BGN16.2 en sobrenadante de un cultivo de la cepa transformada B4 en MM con 2% glucosa (Sob); BGN16.2 en sobrenadante hervido de un cultivo de la cepa transformada B4 en MM con 2% glucosa (SobH); BGN16.2 en sobrenadante dializado en tampón acetato a pH 5,5 de un cultivo de la cepa transformada B4 en MM con 2% glucosa (SobD); BGN16.2 en sobrenadante de un cultivo de la cepa transformada B4 en MM con 2% glucosa + 1 µM bestatina (+bes); BGN16.2 en sobrenadante de un cultivo de la cepa transformada B4 en MM con 2% glucosa + 1 µM leupeptina (+leup); BGN16.2 en sobrenadante de un cultivo de la cepa transformada B4 en MM con 2% glucosa + 1 µM pepstatina (+peps). Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-BGN16.2. La flecha indica BGN16.2 con el tamaño correcto (43 kDa). El corchete indica proteína parcialmente degradada y reconocida por el anticuerpo. Cuando no se indica, el pH de los sobrenadantes alcanza valores de 2,5-2,8. M: marcador de peso molecular

7. Clonación de una proteasa ácida de *T. harzianum*

Si bien la producción de BGN16.2 obtenida a partir de la cepa transformada B4 era bastante alta, el hecho de que resultara una proteína sensible a la acción de proteasas hacía especialmente interesante la posibilidad de clonar y, posteriormente, interrumpir genes de proteasas ácidas con el fin de incrementar la cantidad de β -1,6-glucanasa II. Dado que se conocen muchas proteasas ácidas de hongos, se alinearon sus secuencias con el fin de conocer los dominios más conservados (Fig. 22). De dichos dominios, se infirió la secuencia de ADN más probable y, de acuerdo al sesgo de codones de *Trichoderma* y a la secuencia de una proteasa ácida clonada de *T. reesei* (Mäntylä *et al.*, 1994), se diseñaron unos oligonucleótidos con los cuales se realizó una reacción de PCR. Las condiciones de reacción fueron: 2' a 94°C; 35 ciclos de 30" a 94°, 1' a 55°C y 1' a 72°C; y finalmente 7' a 72°C. Se obtuvo una banda del tamaño deseado de unas 900 pb usando 5 mM de MgCl₂. La secuencia obtenida con esta banda se sometió a un BLASTX con el fin de obtener las proteínas a las cuales se parecería la proteína hipotética producida por nuestro fragmento, y se obtuvieron secuencias de proteasas ácidas.

El fragmento de 900 pb obtenido se usó como sonda para escrutar una genoteca genómica de *T. harzianum* CECT 2413, realizada en λ GEM-11®. Se aisló una calva que hibridaba con la sonda. Se extrajo el ADN de los fagos y se

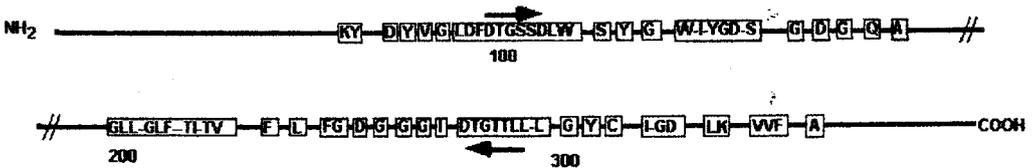


Fig. 22: Esquema representativo de los aminoácidos conservados entre las distintas pepsinas fúngicas. Las flechas indican las secuencias a partir de las que se dedujeron las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para clonar la pepsina de *T. harzianum* CECT 2413.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

cortó con *SaII*. Los fragmentos obtenidos se hibridaron con el producto de la PCR y un fragmento de 5 kb que hibridaba con la sonda se ligó a pSK+® cortado con la misma diana. A partir de la secuencia de la sonda se obtuvieron oligos para secuenciar 3 kb del clon genómico. En la Fig. 23 se representa dicha secuencia, junto con la secuencia de la hipotética proteína producida por ella. Al gen se le denominó *papA*.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

```

1 ATC GAG GcA CGG CAT GGA ACG TeT Ggc TGG CTT ██████████ ATG Ttg ACG TGA GTT GtG CcA
TgA GAG TTA CTG CGT GTG TTT GCG GCT GgA TGG GTG ATT GAT ggg GGA cTG AGC AGT GGG
AAT CAG TGG AAC ATC ATG GCA ACA TCG CTC GGA GGT TGG GGT TAG CCT CGT CGT CTG TCT
181 CCG GAT CAA CTT CAT CGC AGC AAA GAC TGC GGC GCA GCA TTT CCG CCG AAG TCG CGT CGG
CCC GTT TCG CTA CGA GAC CCA AGT CAT GTC ACG AAG CAC GGA CTG CGA TTC GAG TGT CAG
AAG CCG GTT GCT T ██████████ AGA TCG GCA TTG GGG AAT CCT CGT TTC AAG GGC CCT TCT CCC
CAT CGT TAA AGC CGC AAA CAC AAC AAT AAC CCC GGA TTG GAC GGA GCG CCT AAG GTG GCG
AGG ACT ATT GTT AAA GCA CCA TCT GTA C ██████████ CCG GGC TGG AGA CTG CCT TGG AGC GCC
481 GGT CCC CGA ACC AGT AGT TGT GGC CAT GAA CTA ATA CTC TGG ACT TC ██████████ TTG GGA TGA
AGG AC ██████████ CGT GAT CGA CAA AGG TTC CAG AGT CTC CAT TGA AGC AAG GCA GAA ATG GCA
ATA CGC TCT CGG CGG GCT TCA CTC TCT GGG CTA AAC AAC TAG GCG CCT TCT CCA ██████████ CTG
GAC GTG AGA GTT TGA TTC GTC CAC AGC CTG GTG ACT ACG AGC ██████████ TAG C ██████████ AAG CTG
██████████ CT GAT GTC GAT TCC ACC ATC TTG ACT CCT CTC CCC ATC ACC AAG CCC CAG CAA GTG
TGT GAA TAC CCA GGA TGA TGG CGC AAA ATG ACC TTC CTA AAT CAT GCT CTT GAA GCC GTC
841 AAC AAG GCC GTG GAG CTG AGC AAC TCC AA ██████████ TTT GAC CTC AAA ██████████ GA TTG GCA TAC
GAC CCT GGA TGG ATA TAA AGT CGT TCA TCT ██████████ CTC GAT GTC TTG AAG TTT TTG TCT
CAT CAG CCT TCA AGA CAA CCA GTC TAG TCT ACT CCT GAA TCC TTC AAA ATG CAG ACC TTT
M Q T F
GGT GCT TTC CTC GTT TCC TTC CTC GCC GCT AGC GGC ATG GCT GCG GCT CTC CCC ACT GAG
G A F L V S P L A A S G M A A A L P T E
GGA CAG AAG ACC GGT TCC ATC GAG GTC GCT TAC AAC AAG AAC TAC GAT GTC CCC GAC GGT CCT
G Q K T A S I E V A Y N K N Y V A H G P
ACC GCT CTC TTC AAG GCC AAG AGA AAG TAC GGC GCT CCC ATC AGC GAC AAC CTC CGC GCT
T A L F K A K R Y G A P I S D N L R A
GCC GTG GCT GCC AAG CAC TCC CTC ACC AAG CGC CAG ACT GGC TCT GCC AAC ACC AAC CCC
A V A A K H S L T K R Q T G S A N T N P
AGC GAC AGC GCC GAT GAC GAG TAC ATC ACC AGC GTC TCC ATT GGT ACT CCC GGT CAG GTC
S D S A D D G E Y I T S V S I G T P A Q V
CTC CCC CTG GAC TTT GAC ACC GGT TCC TCC GAC CTG TGG GTC TTC AGC TCC GAG ACT CCC
L P L D F D T G S S D L W V F S S E T P
AAG TCT TCC GCC TCC GGA CAC GCT CTC TAC AGC CCC TCC AAG TCT TCC ACT GCC AAG AAG
K S S A S G H A L Y S P S K S S T A K K
CTC TCC GGC TCT ACC TGG TCC ATT GAG TAC GGT GAC AAG AGC AGC TCC AGC GGC GAT GTC
L S G S T W S I E Y G D K S S S G D V
TAC ACC GAC ATT GTC ACC ATT GGC GGC TTC AGC GTC AAG ACT CAG GCT GTT GAG TCT GCC
Y T D I V T I G G F S V K T Q A V E S A
ACC AAG GTT TCC ACC CAG TTC GTT CAG GAC ACC GTC ATC TCT GGC CTC GTC GGT CTT GGC
T K V S T Q F V Q D T V I S G L V G L G
TTC GAC ATT GGC AAC CAG GTC TCG CCC CGT CCC CAG AAG ACC TGG TTC TCC AAC GCT GCC
F D I G N Q V S P R P Q K T W F S N A A
AGC AGC CTG GCT GAG CCC CTT TTC ACT GCC GAT cTG AGG CAC GAG ACC GGA AGC TAC
S S L A E P L F T A D L R H Q E T G S Y
AAC TTT GGC TTT ATT GAC ACC TCT CTT GCC AAG GGC ACC ATT GGC TAC ACT CCC GGT GAT
N F G F I D T S L A K G T I G Y T P A D
GGC AGC GAG GGT TAC TGG GGC TTC ACT GCC ACC GGT TAC TCC GTT GGC GGT GCC AAG TTG
G S E G Y W G F T A T G Y S V G G A K L
AAC CGC AAC TCC ATC ACC GGT ATT GCC GAC ACT GGC ACC ACC cTG CTC CTC CCC GAC
N R N S I T G I A D T G T L G L L P D
AAC ATT GTT GAT GCC TAC TAC AAC AAC GTG GAG TCC GCT CAG TAC GAC GAC TCC CAG GAG
N I V D A Y Y N N V E S A Q Y D D S Q E
GGT GTT GTC TTC GAC TGC TCT GAG GAC CTC CCC TCT TTC TCC TTC GGT GTT GGT GGC CAG
G V V F D C C S E D L P S F S F G V G G Q
ACT ATC ACC ATC TCC GGC GAC CTG TTG AAC CTC ACC CCC ATT GAG GAG GGC AGC TCC ACC
T I T I S G G D L L N L T P I E E G S S T
TGC TTC GGT GGT CTC GAG AGC GCT GAC ATT GGC ATC AAC ATC E T T GGT GAT GTT GCC
C F G G L Q S S A D I G I N I F G D V A
CTC AAg GCT GCC CTG GTC GTC TTT GAC CTC GGC AAC GAG CGT CTC GGC TGG GCC CAG AAA
L K A A L V F D L G N E R L G W A Q K
TAA GCG ATT GAT GGA ATG GGA AAT TTC TTT TAT GAA GGT CAT GAT TTG AAG GGA TGA AGC
TGA ACA AAA AAT TGG GGG AGA CTA TAT ATG GCT CTC ATG ATT TGT AAA TAC GAT ATC ATG
TTG TAT ATA GCC TTG GGA ATT TTA GCA CAT AGC GAA GCA AAA AAA TTA TAT TCA ACT GGG
AAA TTT TGA GTC CAT CTT TGA GTG AAA TAG GAT TGT AGC TGA TAT TGT GAA ATG TGT TTT
ATA ACT ACC TTA GGT ATT TAA GAG GTT ATT GTT GGA TTA GTA GTT GAT AAT GAT ATG AGT
TGT GTT TAA TGC CCC TTT GTG AAT CAG TTG TAA AGG CAA TAT TTA TTA AAG GTT TCC TAG
CAG GGC TGA ACT GAT ATT CCA CTT TTG TAA GCT TGA AAT CTA CTT GGT CAA CTG ACC ACA
TGT CTG GAA TGC TGT TTA TCG GAA CAG CTC CAA AAT ACC ATT TTG TCA AGG ACC TTA CCT
GTA TGA AGC TAG TAG GCA AAA GAA GTG GCA TCT GCC CGG TTA CTG TCG ATT ATG CgA CgG
GTG GAT GAG TAG gCG TgA ATT GAG AAT TGG ATG GCG TGA GCC CCC CAg ATA CCG tAG CTA
TTT GTA TGA CAA GTG AAA TCC ATA TCC AAT TTT CAG CAG TTA GGA GCA gCA GAG GTA ACA
GTC CAA GTa TGA gAA TCA AGA ATT TTT TGA ACT TGT TTA gAg

```

Fig. 23: Secuencia del gen *papA* y la proteína que se deduce de ella incluyendo la zona del promotor. Se han sombreado las cajas Pac (5'GCCARG), STRE (5'CCCCT) y de unión de AreA (5'GATA). También se han señalado las cajas CAAT y TATA.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

El análisis de la secuencia de ADN aporta varias características interesantes. En primer lugar la ausencia de intrones, a diferencia de su homóloga en *T. reesei*. El clon genómico contiene aproximadamente 1 kpb correspondientes al promotor. Su análisis con el algoritmo MatInspector nos revela, entre otras cajas de menor relevancia, la presencia de múltiples cajas AreA (relacionadas con regulación de nitrógeno en *Aspergillus*, Ravagnani *et al.*, 1997), cajas STRE (implicadas en la regulación en condiciones de estrés, Martínez-Pastor *et al.*, 1996) y, finalmente, una caja PacC (vinculadas a la regulación por pH, Tilburn *et al.*,

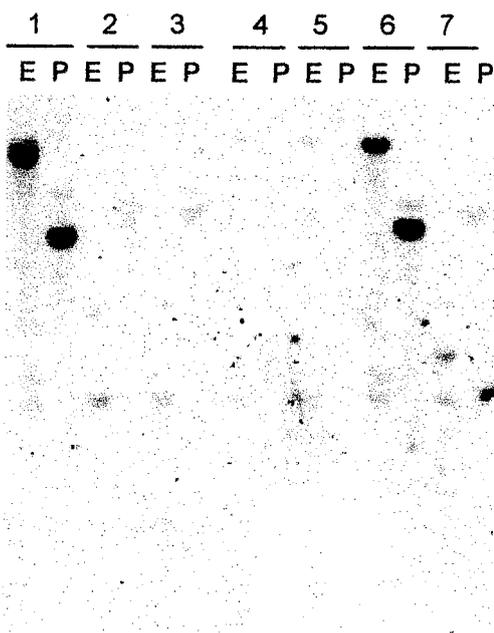


Fig. 24: Southern-blot realizado sobre 10 µg de ADN genómico de las cepas indicadas cortado con *EcoRI* (E) o *PstI* (P). Se utilizó como sonda el fragmento de 900 pb obtenido de la PCR. 1) *T. harzianum* CECT 2413, 2) *T. harzianum* IMI206040, 3) *T. reesei* QM 9414, 4) *T. koningii* CECT 2412, 5) *T. longibrachiatum* CECT 2606, 6) *T. viride* CECT 2423, 7) *H. jecorina*.

1995). Esta última se presenta muy alejada del inicio de transcripción y, en principio, en solitario. Sin embargo, se señala por la importancia de la regulación de las proteasas por pH. En la secuencia del promotor se encuentra asimismo señaladas las secuencias TATAA y CAAT, relacionadas con el inicio de la transcripción. No se observa una señal canónica de poliadenilación, aunque esto no parece ser determinante a la hora de procesar el mensajero. Sí hay una gran cantidad de pares AT.

El contexto del triplete de iniciación está bastante conservado. En *Trichoderma* se ha propuesto (T/C)CAA(A/C) delante del AUG (Goldman *et al.*, 1998), lo que correlaciona perfectamente con lo encontrado en el gen *papA*: TCAAA. Sin embargo, en la zona codificante no se encuentra ninguna de las zonas consenso parecidas.

Se realizó un experimento de Southern-blot sobre ADN genómico de diferentes cepas de *Trichoderma* (Fig. 24). Se observó que el gen está presente en *T. harzianum* CECT 2413 en una copia, aunque existen secuencias similares, como se observa por las bandas de menor intensidad. Como ocurre con otros genes (Rey *et al.*, 1998) *T. viride* es la especie que presente un patrón más parecido. El gen está presente en todas las cepas de *Trichoderma* utilizadas, así como en el hongo *Hypocrea jecorina*, que parece ser la “fase perfecta” de *T. reesei* (Kuhls *et al.*, 1996).

La secuencia de la proteína tiene un posible sitio de corte de péptido señal, localizado usando el algoritmo SignalIP V1.1, que se encontraría entre la posición 20 (A) y 21 (L) (Fig. 25). En cuanto a la existencia de péptido de activación, se observa en la posición 51 la pareja Lys-Arg (KR), descrita en otras proteínas como diana de una proteasa específica, KEX2 (Bussey, 1988), que generaría mediante un corte el enzima maduro y activo. Usando el programa ScanProsite también se han localizado posibles sitios de modificación postraducciona. Son, además de dos dominios de aspartil-proteasas (DTG), sitios de posibles fosforilaciones y

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

<i>Thurstonium_PAPA</i>	1	HQ-----TFGALVSLAAJG--MAALPTEGQKTA-----SIEVAYNKK-----FVANGPTALFK	49
<i>E.parasitica_CARP</i>	1	MSIPLKHALVTABLACGALSSPTXQWVGIPIUMASPEUCGPKYIFKQURMHN---YKFGCPLIUKK	62
<i>Cybaosporoides_GCSAP</i>	1	HT-----LITALTAGLALAS---SVIGAPTRHAKMK-----RFTVDQIKMFR---YIRMGPLALAK	50
<i>P.ansarima_PAPA</i>	1	HVS-----LTDLFLASLLVPTSPQLCLPPIRDTIDQRG--GRUTLKQVRNPRG--HMAFPBARATYR	58
<i>P.janthinellum_PEPS</i>	1	HV-----SFTQLQLAFLGLSALGAAVPUTGTSKKK-----FSLNQVK--VAGTKTKNPAENYAN	53
<i>A.niger_PAPA</i>	1	HV-----VF3KTAALVLGLSTAVSAAPAP-TR--KG-----FTINQIARPAKKTRTVHLPGLYAR	52
<i>A.ansarimi_PAPA</i>	1	HV-----VF3KTAALVLGLSIAVSAAPAP-TR--KG-----FTINQIARPAKKTRTVHLPGLYAR	52
<i>P.roqueforti_ASFA</i>	1	HV-----VF3QVTVALTCFSAIASAAAVR-QEPPQG-----FTVWQVQAUPGTRVHLPGLYAN	54
<i>Thurstonium_PAPA</i>	50	AKREYGAPIIDMLRAAVALAKNS-----LTKRQTGSANTPSSDAADDEYITVSICTPAQVLP	107
<i>E.parasitica_CARP</i>	63	TYLKYGVPIPAWLEDAVQNSTS-----GLAERTSGSATTPIDSLDDASITPVQICTPAQTLML	121
<i>Cybaosporoides_GCSAP</i>	51	AYRKYKHALPEDLIRVVAHITST-----GATKRATGSAVATQD--YDVEELSPVQICTPAQTLT	109
<i>P.ansarima_PAPA</i>	59	TYLKYGVPAVDYIKKAVAHIDEEQEEAPARIKNDTGSAAAIPIEVEDIAYVTPVITCTPPQTLML	123
<i>P.janthinellum_PEPS</i>	54	ALRKYGAEPVSHVLAASAAAT-----GSUTTSPTF--FDSEYLPIDVQ--GTTNML	100
<i>A.niger_PAPA</i>	53	ILAKYFGTVPQVKEAAAK-----GSAVTPPQN--MDEEYLPVPTG--KSTLHL	98
<i>A.ansarimi_PAPA</i>	53	ILAKYFGTVPQVKEAAAK-----GSAVTPPQN--MDEEYLPVPTG--KSTLHL	98
<i>P.roqueforti_ASFA</i>	55	ALVYKCATVPATVHAASV-----GSAITTEPA--DDVEYLPVPTIG--SSTLML	100
<i>Thurstonium_PAPA</i>	108	DFDTGSSDLGWFSSSETPKSSASGHALYSPKSSSTAKKLSGTSWISYEGDKSSSSGDUYTDYITG	172
<i>E.parasitica_CARP</i>	122	DFDTGSSDLGWFSSSETTASEVDGQITPTPKSSTAKKLSGATWSISYEGDSSSSGDUYTDYVSG	186
<i>Cybaosporoides_GCSAP</i>	110	DFDTGSSDLGWFSSSTPSSQRMGQTVVDPKSSSTASRLTGATWSISYEGDSSSSGDUYTDYVSG	174
<i>P.ansarima_PAPA</i>	124	DLDTGSSDLGWFSSSLTPSNQVRGQIISPTKSSSTAKKLSGTSWISYEGDSSSSGDUYTDYITG	188
<i>P.janthinellum_PEPS</i>	101	DI DTGSSDLGWFSSKELPSSSETSCHAVYSP--SSQSQLLWYSSWISYEGDSSSSGDUYTDYVSG	163
<i>A.niger_PAPA</i>	99	DFDTGSSDLGWFSSDELPSSEQTENLPTP--SSSATKLSGTSWISYEGDSSSSGDUYTDYVSG	161
<i>A.ansarimi_PAPA</i>	99	DFDTGSSDLGWFSSDELPSSEQTENLPTP--SSSATKLSGTSWISYEGDSSSSGDUYTDYVSG	161
<i>P.roqueforti_ASFA</i>	101	DFDTGSSDLGWFSSSELTSSSQSCHVYVNV--GSLCTKLISGASWSISYEGDSSSSGDUYTDYVSG	163
<i>Thurstonium_PAPA</i>	173	GF3VKTQAVESATKUSTQVQDVTISGLVGLGFDI6NQVSPRQKQV3HAA3SLAEPLFTADLR	237
<i>E.parasitica_CARP</i>	187	GLTPTQAVESAKRVS3SFTEDSTIDGLLGLAFITLNTV3PTQKRTFFDRKASLDS3PQFTADLR	251
<i>Cybaosporoides_GCSAP</i>	175	3LSVTQAVESAA3NV33SFSSESDLDGLLGLGFS3INTV3SPTQKRTFFDRAKSLD3PQFTADLR	239
<i>P.ansarima_PAPA</i>	189	GLVKS3QAVQALV3S3MLTQEQILDGLVGLGFS3ALNTV3P3QLTFFDRNAPKLDDEE3FTADLR	253
<i>P.janthinellum_PEPS</i>	164	GVTA33QAVEAAETI3SEFQDQPS--DGLMGLAF33INTVQPS3QSTFFDRNQ3MLA3P3FTADLR	227
<i>A.niger_PAPA</i>	162	GVTTKQAVEAA333SEFVQD3TAMDGLLGLAF33INTVQPKAQ3TFFDTV33QLD3PLFAVQLK	226
<i>A.ansarimi_PAPA</i>	162	GVTTKQAVEAA333SEFVQD3TAMDGLLGLAF33INTVQPKAQ3TFFDTV33QLD3PLFAVQLK	226
<i>P.roqueforti_ASFA</i>	164	GVKATGQAVEAAK333QFLQDKM3DGLLGLAF33INTV3SPTQKRTFFDTV33GL3EPLFAVTLQ	228
<i>Thurstonium_PAPA</i>	238	HQ--ETG3YMF3FIDT3LAKGT3CTPADG3EGY3GFTATG3V3G3AKLMR33IT3GIADT3TLLL	301
<i>E.parasitica_CARP</i>	252	YH--APG3YMF3FIDT3AYT3G3ITPTAV3TXQ3F3W3T3T3G3AV3G33T3K333ID3GIADT3TLLY	315
<i>Cybaosporoides_GCSAP</i>	240	HN--TPG3YMF3FID3S3AT3G3AIT3V3ID3SD3G3W3Q3T333G3Y3G33A3T3333L3NG3IADT3TLLL	303
<i>P.ansarima_PAPA</i>	254	YH--ATG3YDF3FID3K3K3Y3AG3IT3TAV3Q3S3P3G3W3H3L33G3Y3G33G3AF3Q33I3G3I3D3T3TLLY	317
<i>P.janthinellum_PEPS</i>	228	YH--APG3YDF3FID3S3K3H3G33V3T3P3V3M3S3Q3F3W3G3T3AS3G3AV3G33G3T3V3333G3IADT3TLLL	291
<i>A.niger_PAPA</i>	227	HD--APG3YDF3FID3S3K3Y3T3G3I3T3TD3D3S3Q3F3W3G3T3D3G33333G3S3IADT3TLLI	290
<i>A.ansarimi_PAPA</i>	227	HD--APG3YDF3FID3S3K3Y3T3G3I3T3TD3D3S3Q3F3W3G3T3D3G33333G3S3IADT3TLLI	290
<i>P.roqueforti_ASFA</i>	229	GTG3P3W3L3R3F3ID3S3K3Y3T3G3L3A3D3V3D3S3D3G3W3T3D3S3K3I3G3A3G3K3--IT3GIADT3TLLL	292
<i>Thurstonium_PAPA</i>	302	LPD3IVD3AT3Y3M3--V3S3AQ3Y3D3S3Q3E3V3F3D3C3S3D3L3P3S3F3G3G3Q3T3I333D3L3L3T3P3I3E3G3S3T3	365
<i>E.parasitica_CARP</i>	316	LPAT3VV3AY3AQ3--V3G3AK3S3S3V3G3Y3V3F3P3C3AT3L3P3T3F3G3S3AR3I3V3I3P3G3Y3I3D3F3G3I3T3G3S3S3C3	379
<i>Cybaosporoides_GCSAP</i>	304	LPQ3VV3AT3Y3AK3--Y3G3AK3Y3S3Q3G3Y3T3P3C3AT3V3S3T3F3G3S3AR3V3T3I3P3S3H3W3Y3AV3T3--S3C3	365
<i>P.ansarima_PAPA</i>	318	LPT3IVT3AT3Y3R3--V3Q3AQ3S3Q3Y3G3Y3V3F3C3S3T3L3P3T3T3F3G3I3G3AR3T3I3P3AS3Y3I3N3T3R3I3P3T3I3T3C3	381
<i>P.janthinellum_PEPS</i>	292	LPS3I3V3K3Y3AQ3--V3K3S3S3S3AT3Y3G3Y3V3F3C3S3AT3L3P3T3V3I3N3G3Y3AV3IAA3Q3L3N3S3P3U3E3T3G3S3T3C3	355
<i>A.niger_PAPA</i>	291	LDD3I3V3AN3Y3EQ3--V3G3AQ3S3Y3E3AG3Y3V3S3C3T3D3L3P3D3T3V3I3G3Y3AV3V3P3G3K3I3N3P3A3V3T3G3S3T3C3	354
<i>A.ansarimi_PAPA</i>	291	LDD3I3V3AN3Y3EQ3--V3G3AQ3S3E3E3AG3Y3V3S3C3T3D3L3P3D3T3V3I3G3Y3AV3V3P3G3K3I3N3P3A3V3T3G3S3T3C3	354
<i>P.roqueforti_ASFA</i>	293	LDS3I3V3T3G3L3Q3E3Y3P3G3Q3S3S3AG3Y3I3P3C3AT3L3P3D3T3V3I3N3G3Y3AV3V3P3G3K3I3N3P3A3V3T3G3S3S3C3	357
<i>Thurstonium_PAPA</i>	366	F3G3L3Q3S3AD3I3G3I3N3I3F3G3V3AL3K3A3L3V3V3D3L3G3E3--R3L3G3AA3Q3---	404
<i>E.parasitica_CARP</i>	380	F3G3I3Q3S3AG3I3G3I3N3I3F3G3V3AL3K3A3L3V3V3F3G3A3T3P3L3G3F3A3K3---	419
<i>Cybaosporoides_GCSAP</i>	366	F3G3L3Q3S3S3G3I3G3I3N3I3F3G3V3AL3K3A3L3V3V3D3G3A3E3--R3L3G3AA3K3L3S3---	407
<i>P.ansarima_PAPA</i>	382	F3G3L3Q3S3S3L3G3I3N3I3F3G3V3AL3K3R3A3L3V3V3S3G3T3H3P3I3G3F3A3K3P3L3A3---	425
<i>P.janthinellum_PEPS</i>	358	F3G3I3Q3S3D3T3I3G3I3F3G3D3I3F3L3S3Q3V3V3D3A3S3G3P3--R3L3G3F3A3Q3---	394
<i>A.niger_PAPA</i>	355	F3G3I3Q3S3S3L3G3L3I3L3G3D3V3L3K3S3Q3V3V3F3S3E3G3P3--K3L3G3F3AA3Q3---	394
<i>A.ansarimi_PAPA</i>	355	F3G3I3Q3S3S3L3G3L3I3L3G3D3V3L3K3S3Q3V3V3F3S3E3G3P3--K3L3G3F3AA3Q3---	394
<i>P.roqueforti_ASFA</i>	358	F3G3I3Q3S3S3I3G3S3I3F3G3D3I3F3L3S3Q3V3V3F3S3E3G3P3--R3L3G3F3AA3Q3---	397

Fig. 26. Alineamiento de la secuencia de la proteína PAPA con las proteasas con las que mostró mayor similitud en el análisis BLASTX.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

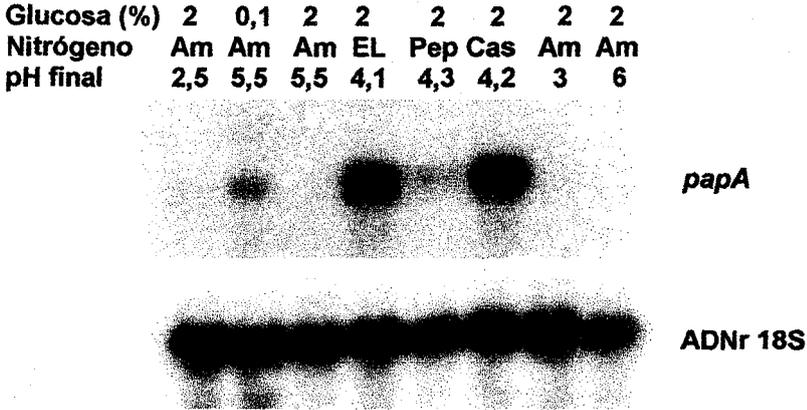


Fig. 27: Experimento de Northern-blot realizado con ARN total extraído de micelio de *T. harzianum* CECT 2413 crecido durante 24 horas en MM en las condiciones indicadas. En todos los cultivos se utilizó glucosa como fuente de carbono. Las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron: 0,5% sulfato amónico (Am), 1% extracto de levaduras (EL), 1% peptona (Pep) y 1% caseína (Cas). Los cultivos con pHs finales de 3 y 6 fueron tamponados con tampón citrato y MES-KOH, respectivamente. Previamente todos los micelios crecieron durante 40 horas en MM con glucosa y sulfato amónico. El fragmento obtenido para escrutar la genoteca fue utilizado como sonda en el panel superior. El ADNr 18S de rábano fue utilizado como control de carga en el panel inferior.

8. Regulación de la proteasa ácida *papA*

Para conocer el patrón de regulación de la proteasa *papA* se realizaron experimentos de Northern-blot a partir de micelio cultivado en diversas condiciones (Fig 27). El gen se expresa muy débilmente en condiciones de hambre de carbono, y está reprimido cuando hay quitina presente como única fuente de carbono. La fuente de nitrógeno parece regular fuertemente la expresión del gen, ya que se observa una fuerte inducción en presencia de las fuentes de nitrógeno

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

Glucosa 2 %	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Glicerol 2 %	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Amonio 0,5 %	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Caseína 1 %	-	-	+	-	+	-	-	+	+
pH del tampón						3	8	3	8

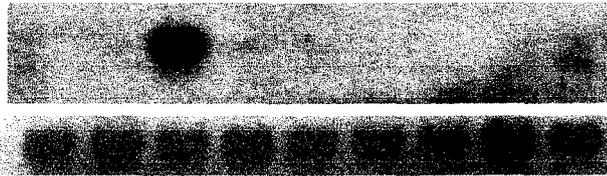


Fig. 28: Experimento de Northern-blot realizado con ARN total extraído de micelio de *T. harzianum* CECT 2413 crecido durante 24 horas en MM en las condiciones indicadas. Los cultivos con pHs finales de 3 y 8 fueron tamponados con tampón citrato y Tris-HCl, respectivamente. Previamente todos los micelios crecieron durante 40 horas en MM con glucosa y sulfato amónico. El fragmento obtenido para escrutar la genoteca fue utilizado como sonda en el panel superior. El ADNr 18S de rábano fue utilizado como control de carga en el panel inferior.

orgánicas, como extracto de levadura o caseína. El pH bajo, sin embargo, no parece inducir la expresión del gen.

Se observó también (Fig. 28), que el gen *papA* no se expresaba en micelios cultivados en medios con escasez de nitrógeno. Asimismo, sorprendentemente, el glicerol reprimía la expresión del gen incluso en presencia de caseína. En los cultivos tamponados, la represión por amonio persistió a pH 3 y a pH 8, mientras que sólo una débil expresión se observó en cultivos con caseína como fuente de nitrógeno y tamponados a pH 8.

Las actividades proteasa de las cepas transformadas para el gen *bgn16.2* eran similares a las de la cepa silvestre. Sin embargo, el gen *papA* podría estar desregulado en las cepas transformadas, aunque no provocara un aumento detectable de la actividad proteasa total. Cuando se realizaron experimentos de

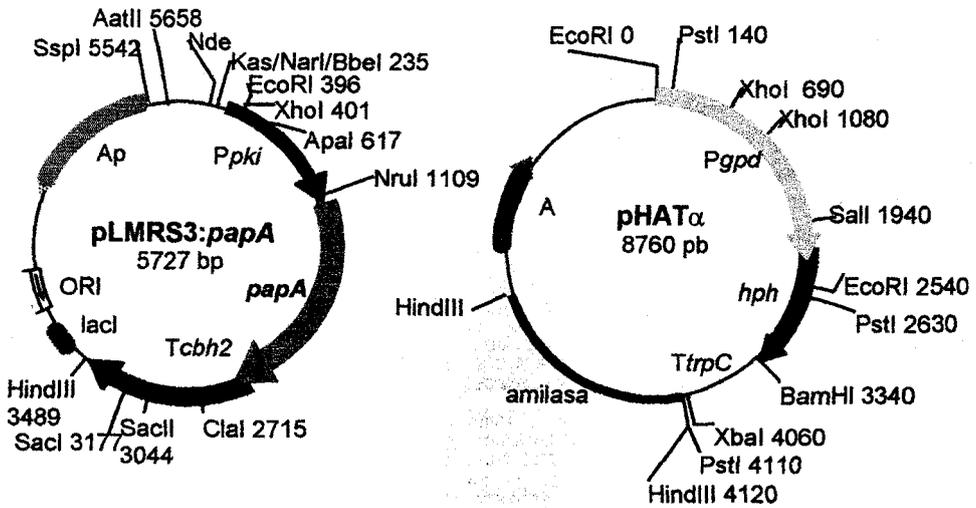


Fig. 29: Esquema de los vectores pLMRS3::pap y pHATα.

Northern-blot, se observó que la proteasa *papA* tenía el mismo patrón de regulación en la cepa silvestre y en la cepa B4 (datos no mostrados).

9. La proteasa *papA* no parece influir en la estabilidad de BGN16.2

Aunque el patrón de regulación de la expresión de *papA* no coincide con el de degradación de la BGN16.2, la proteasa *papA* podría ser responsable de la degradación parcial que sufre la β -1,6-glucanasa II en condiciones en las que ambas están presentes en el medio de cultivo. Así, resultaba interesante obtener cepas tanto que superprodujeran la PAPA como disruptas para el gen *papA* en fondos silvestre y la cepa transformada B4.

La superproducción de PAPA se llevó a cabo siguiendo el mismo esquema que para la de BGN16.2. En este caso, se clonó la ORF bajo el control del promotor de la piruvato quinasa de *T. reesei*, utilizando para ello el mismo vector pLMRS3, que ya se ha descrito. Sin embargo, y dado que la cepa B4 ya es *amdS*⁺,

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

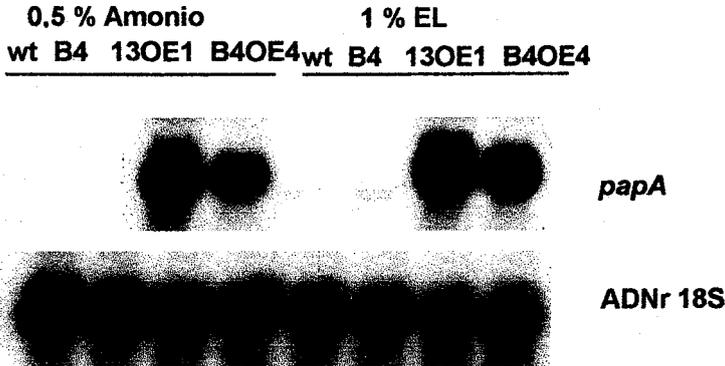


Fig. 30: Northern-blot realizado con ARN total extraído de micelios crecidos durante 24 horas en MM suplementado con 2% de glucosa y 0,5% de sulfato amónico o 1% de extracto de levadura (EL) como fuente de nitrógeno. Previamente se cultivaron los micelios en MM con 2% de glucosa y 0,5% de sulfato amónico durante 40 horas. Las cepas utilizadas fueron *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y la derivada de ésta transformada para la sobreexpresión de *papA* (13OE1); así como la cepa que sobreexpresa el gen *bgn16.2* (B4) y la derivada de ésta transformada para la sobreexpresión de *papA* (B4OE4). Se usó como sonda la ORF de *papA* y el ADNr 18S de rábano con control de carga.

hubo que recurrir al uso del marcador *hph*, que confiere resistencia a la higromicina. Se cotransformaron las cepas CECT 2413 (silvestre) y B4 (la transformada superproductora de BGN16.2) con los vectores pLMRS3::*papA* y pHT α (Fig. 29). Este último tiene al gen *hph* bajo el control del promotor del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *A. niger*. De hecho pAHT α es un derivado del vector pAN7-1, que tiene insertadas 2,4 kb de una amilasa de *T. harzianum* y que confiere al vector una mayor estabilidad en el genomio de *Trichoderma* (Herrera-Estrella *et al.*, 1990).

Siguiendo el mismo método de transformación de protoplastos (PEG-CaCl₂) con las modificaciones señaladas en “Materiales y métodos”, y el mismo esquema de estabilización de las cepas transformadas, se obtuvieron cepas transformadas y estables. Se procedió entonces a extraer el ARNm de las cepas

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

transformadas en condiciones de represión (sulfato amónico como fuente de nitrógeno) e inducción (extracto de levadura como fuente de nitrógeno) de *papA*. Se seleccionaron dos cepas que sobreexpresaban el gen: una de fondo CECT 2413 (silvestre), que denominaremos 13OE1 y otra, de fondo B4 (la cepa transformada), que llamaremos B4OE4 (Fig. 30).

TABLA 1.7. Actividades proteasa y β -1,6-glucanasa en las cepas silvestre, B4 y transformadas para la expresión constitutiva del gen *papA* cultivadas en medio con amonio o extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Cepa	Amonio		Extracto de Levadura	
	Proteasa (mU/g)	β -1,6- Glucanasa (U/g)	Proteasa (U/g)	β -1,6- Glucanasa (U/g)
wt	2,36 \pm 0,5	nd	10,9 \pm 1,3	nd
B4	3,66 \pm 1,6	nd	11,7 \pm 0,2	124,6 \pm 7,4
13OE1	2,66 \pm 0,6	nd	44,6 \pm 1,4	1,1 \pm 0,1
B4OE4	3,28 \pm 1,0	nd	47,5 \pm 1,7	185,5 \pm 25

nd: no detectada

Experimentos de Southern-blot indicaron que las cepas 13OE1 y B4OE4 tienen copias adicionales de *papA*. La integración, como en el caso de *bgn16.2* se realizó de manera ectópica en tándem y también como integraciones únicas (no mostrados).

Para verificar si la expresión de *papA* tiene efecto sobre la estabilidad de BGN16.2 se cultivaron las cepas parentales (silvestre y B4) y las cepas transformadas productoras de PAPA (13OE1 y B4OE4) en medios con sulfato amónico o con extracto de levadura como fuente de nitrógeno. La actividad proteasa medida en los sobrenadantes de dichos cultivos revela que las cepas superproductoras de PAPA tienen una actividad proteasa más alta (Tabla 1.7). Ese aumento es detectable cuando los micelios se cultivaron en medios con extracto de levadura, pero no en sulfato amónico. Como ocurría con la proteína BGN16.2: en medios con glucosa y sulfato amónico no se observa superproducción alguna de la

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

proteasa. Tiñendo con Coomassie las proteínas obtenidas de esos medios de cultivo se detectaron las proteínas PAPA y BGN16.2 coexistiendo sólo en medios con extracto de levadura como fuente de nitrógeno (Fig. 31). IEF y zimograma de sobrenadantes de esos cultivos revelan la presencia de sólo una proteína con actividad proteasa sobreexpresada y de pI aproximado de 4,5, muy cercano al obtenido de la secuencia de la proteína deducida de la de ADN. Se observa también que la proteasa PAPA superproducida por la cepa wtOE1 es inhibible por pepstatina, pero no por PMSF (Fig. 32)

Se procedió a medir la actividad β -1,6-glucanasa en los mismos sobrenadantes (Tabla 1.7), comprobándose que la actividad β -1,6-glucanasa es igual en los sobrenadantes de ambas cepas. Por otro lado, se realizaron

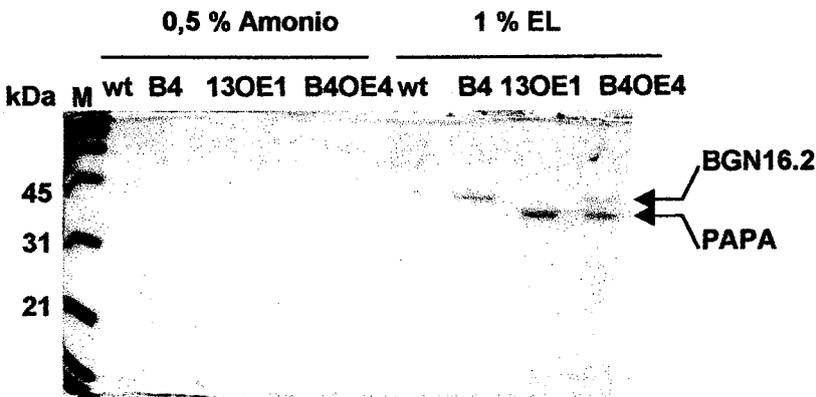


Fig. 31: Tinción con coomassie (Brilliant Blue R-250) de las proteínas extracelulares obtenidas concentrando sobrenadantes de cultivos de micelios crecidos durante 24 horas en MM suplementado con 2% de glucosa y 0,5% de sulfato amónico o 1% de extracto de levadura (EL) como fuente de nitrógeno. Previamente se cultivaron los micelios en MM con 2% de glucosa y 0,5% de sulfato amónico durante 40 horas. Las cepas utilizadas fueron *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y la derivada de ésta transformada para la sobreexpresión de *papA* (13OE1); así como la cepa que sobreexpresa el gen *bgn16.2* (B4) y la derivada de ésta transformada para la sobreexpresión de *papA* (B4OE4). M: marcador de peso molecular.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

wt 13OE1 +peps +PMSF



Fig. 32: Inhibición de la proteasa PAPA. Se utilizaron sobrenadantes concentrados de cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 (wt), de la cepa transformada que produce PAPA sin incubar con inhibidores (13OE1) o tratado 30 min a 30°C con 1μM de pepstatina (+peps) o 0,1 mM de PMSF (+PMSF). Posteriormente fueron separados mediante isoelectroenfoque (pH 3,5-9,5). La actividad proteasa fue revelada mediante un zimograma, realizado por impresión del gel de isoelectroenfoque sobre un gel de BSA (hecho en tampón acético-acetato a pH 5,5).

inmunodetecciones que corroboraban que esa actividad se debía a la existencia de la proteína BGN16.2 en las cepas B4 y B4OE4 (Fig 33), indicando que la expresión de la proteasa *papA* no altera, por sí sola, la producción de BGN16.2. Estos experimentos se repitieron en medios tamponados a pH6 con glucosa y amonio, y los resultados fueron idénticos.

En este trabajo también se ha intentado, aunque sin éxito, la disrupción del gen *papA* en *T. harzianum*. Se usaron regiones flanqueantes que incluían partes de la ORF, así como de promotor o terminador según el caso, de hasta 1,5 kb. Como marcadores se han usado las resistencias a G418 y a higromicina. Si bien se han obtenido cepas transformadas, en ninguna de ellas se había dado la integración homóloga y sustitución del gen *papA*.

Resultados: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

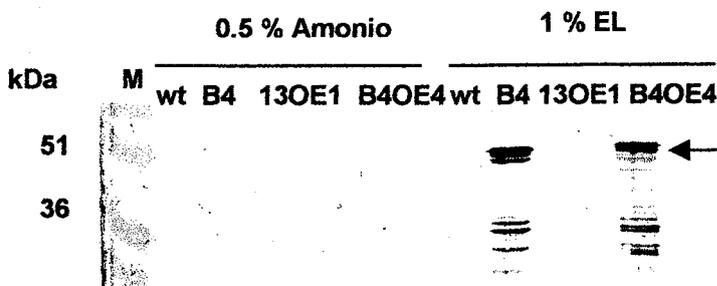


Fig. 33: Inmunodetección de BGN16.2 sobre las proteínas extracelulares obtenidas concentrando sobrenadantes de cultivos de micelios crecidos durante 24 horas en MM suplementado con 2% de glucosa y 0,5% de sulfato amónico o 1% de extracto de levadura (EL) como fuente de nitrógeno. Previamente se cultivaron los micelios en MM con 2% de glucosa y 0,5% de sulfato amónico durante 40 horas. Las cepas utilizadas fueron *T. harzianum* CECT 2413 (wt) y la derivada de ésta transformada para la sobreexpresión de *papA* (13OE1); así como la cepa que sobreexpresa el gen *bgn16.2* (B4) y la derivada de ésta transformada para la sobreexpresión de *papA* (B4OE4). Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-BGN16.2. La flecha indica la proteína BGN16.2. M: marcador de peso molecular.

DISCUSIÓN

1. Patrón de integración del ADN transformante y expresión del promotor *pki*

La sobreexpresión de la proteína BGN16.2 en *T. harzianum* CECT 2413 se llevó a cabo mediante la transformación con un plásmido en el que el ADNc se situó bajo el control de un promotor de un gen de la glucólisis, el que codifica la piruvato quinasa de *T. reesei* (Mach *et al.*, 1994). Según los experimentos de Southern-blot no se obtuvieron inserciones homólogas, ya que tanto la copia endógena de *bgn16.2* como la del gen relacionado (Lora *et al.*, 1995) siguen presentes a la misma altura en la cepa silvestre y en las transformadas. Las inserciones fueron en tándem en su mayoría, aunque también hubo integraciones únicas e ilegítimas. Dado que se transformó con el plásmido cerrado, este comportamiento era el esperado, ya que las integraciones homólogas se ven favorecidas por el uso de ADN lineal (Mach & Zeilinger, 1998). Las integraciones en tándem son las que se dan con mayor frecuencia en las transformaciones de *Trichoderma* (Herrera-Estrella *et al.*, 1990, Goldman *et al.*, 1990, Penttilä *et al.*, 1987).

En tres de las cepas transformadas, B7, B8 y B12, no se vio nada más que una banda de la integración en tándem, además de las propias de la copia endógena. Al cortar con *Xba*I no se observaron las bandas que se esperarían del extremo del tándem que hibridaría con la sonda. Sin embargo, en el Southern-blot hecho al cortar con *Eco*RI, se detectó una banda de unas 4 kb que debe corresponder a una recombinación ilegítima, ya que el corte con *Eco*RI libera sólo el promotor unido al gen (2,3 kb). Este fenómeno de recombinación ilegítima ocurrió también para el vector p3SR2 en las mismas cepas.

El número de copias correlacionó con la cantidad de mensajero obtenida. Se observó además que el promotor glicolítico también estaba activo cuando no había glucosa en el medio, fenómeno ya descrito por Limón *et al.*, (1999). Un

hecho similar se da en *T. reesei*, donde se detecta expresión de xilanasas bajo el control de este mismo promotor en cultivos con xilano como fuente de carbono (Kurzatkowski *et al.*, 1996). Se podría deducir de aquí que productos derivados de la quitina puede que se incorporen a la ruta glucolítica, manteniéndose así en las cepas transformadas la expresión del promotor *pki*. De todos los experimentos de Northern-blot realizados, sólo se observó un descenso de la expresión cuando se usó citrato como única fuente de carbono, lo cual se puede interpretar de manera similar a la situación anterior, es decir, el citrato no se incorpora a la glucolisis. En esas condiciones la expresión del promotor sería de un nivel basal. Hay que señalar que se observó una fuerte expresión en medios en los que se usaron fuentes de carbono difícilmente asimilables por *T. harzianum* como la lactosa; o fuentes de nitrógeno que pueden servir también como fuentes de carbono alternativas a la glucosa, tales como caseína, peptona o prolina. Es decir, la presencia de la glucosa, aún cuando haya otras potenciales fuentes de carbono, provoca una fuerte expresión del promotor *pki*.

2. Las cepas transformadas son mejores antagonistas de *R. solani*

Las cepas que superproducían β -1,6-glucanasa-II fueron mejores agentes de biocontrol contra hongos fitopatógenos, concretamente contra *R. solani*. Aunque en principio se podría pensar que el aumento de sólo una actividad lítica de todas las que dispone *T. harzianum* no supondría una mejora sustancial de las propiedades antifúngicas de *Trichoderma*, en la práctica son ya varios los casos en los que esta mejora se ha comprobado. Cepas de *T. harzianum* que producen mayores cantidades de la proteasa *prb1* controlan mejor que la cepa silvestre las infecciones de *R. solani* sobre algodón (Flores *et al.*, 1997). Curiosamente, y al igual que ocurre con las cepas generadas en este estudio, las que producen más *prb1* no son necesariamente las mejores, lo cual puede deberse a un efecto de toxicidad sobre las propias paredes de *T. harzianum*. También se han mejorado

Discusión: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

cepas de *T. harzianum* por sobreexpresión de las quitinasas CHIT33 (Limón *et al.*, 1999), CHIT42 (Baek *et al.*, 1999) de la β -1,3-glucanasa BGN13.1 (Rincón & Benítez, 2000), de una β -1,4-glucanasa de *T. longibrachiatum* (Migheli *et al.*, 1998) e incluso de una quitinasa de *Serratia marcescens* (Haran *et al.*, 1993). En alguno de estos casos (Rincón & Benítez, 2000, Limón, 1999) se ha constatado el aumento de otras actividades (de una β -1,3-glucanasa en el caso de las cepas transformadas para BGN13.1 y de β -1,3-glucanasas y quitinasas en el caso de las cepas transformadas para CHIT33). Estos datos permiten afirmar que, al menos en estos modelos (hongo micoparásito-hongo fitopatógeno y planta) las enzimas juegan un papel fundamental en el control del hongo fitopatógeno.

La obtención de cepas que sobreexpresan una sola actividad individual permitirá posteriormente realizar formulaciones en las que se combinen distintas actividades adecuadas al patógeno con el que se van a utilizar (Rincón & Benítez, 2000), así como emplear dichas cepas para producir una sola proteína en grandes cantidades y prácticamente pura.

3. Producción de β -1,6-glucanasa II

La expresión del gen *bgn16.2* controlado por el promotor del gen *pki* es alta. Sin embargo, en algunas condiciones de cultivo no se encontró proteína BGN16.2 extracelular. Se descartó la proteólisis intracelular, las modificaciones postraduccionales que alteraran la actividad, o cualquier otra característica importante de la proteína que impidiera su secreción, como causantes de la ausencia de actividad.

Las cepas transformadas mantenían los mismos niveles de otras actividades enzimáticas que la cepa silvestre por lo que no se podía atribuir la falta de BGN16.2 extracelular a que el proceso de integración del ADN transformante hubiera afectado a las capacidades secretoras del hongo. Como se ha indicado

Discusión: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

antes, sí se han observado cambios de expresión en cepas de *T. harzianum* CECT 2413 transformadas con el gen *bgn13.1*, que codifica para la enzima β -1,3-glucanasa I (Rincón & Benítez, 2000). En estas cepas no sólo se expresa el gen *bgn13.1* sino que aumenta la actividad de una β -1,3-glucanasa ácida a pH 3 aunque no se sabe si esto se debe a la integración del ADN o a la generación de alguna señal de estrés por la presencia de la enzima en condiciones no usuales.

En las condiciones más favorables para la producción de BGN16.2, se obtienen, aproximadamente, 43 mg de proteína por g de micelio, esto es, 15 mg por l de cultivo. Comparada con la producción obtenida de otras proteínas en *A. niger* o en *T. reesei* son valores muy inferiores (Verdoes *et al.*, 1995, Mäntylä *et al.*, 1998, Penttilä, 1998) ya que no rondan el gramo por litro mientras que en los casos anteriores se alcanzan los 20 g/l de glucoamilasa y 40 g/l de celobiohidrolasa I, respectivamente. Sin embargo, cabe señalar que los experimentos que se han llevado a cabo no han tenido como fin producir el máximo de proteína. Por ejemplo, los cultivos, una vez reinoculados en el medio de producción, se mantenían sólo 24 horas, un tiempo claramente insuficiente para obtener producciones del orden de gramos por litro.

Por otra parte, mediante electroforesis de SDS-PAGE, se ha observado que la proteína es mayoritaria (alrededor del 90% del total de proteínas), con lo que la purificación total se puede lograr mediante un simple paso de adsorción a pustulan.

Esta misma enzima, BGN16.2 ha sido expresada en *Pichia pastoris* (Bom *et al.*, 1998), aunque la actividad específica obtenida era unas 75 veces menor, y sólo después de la purificación se obtenía una actividad similar (204 U/mg) a la de los sobrenadantes de *T. harzianum*. Un dato relativamente sorprendente es el referido a la estabilidad de la proteína expresada en *P. pastoris*, ya que, según los autores ésta es mínima a pH 7, mientras que la proteína producida en *T. harzianum* es más estable a pH 7 que a pH 5,5 y pH 3. Los autores no dicen cómo midieron la estabilidad, por lo que no se puede argumentar ninguna razón que justifique tal

Discusión: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

diferencia. Por otro lado, otros datos como el punto isoeléctrico o el tamaño de la proteína permanecen inalterados en las proteínas BGN16.2 expresadas en los dos sistemas.

Las otras β -1,6-glucanasas de *T. harzianum* (BGN16.1 y BGN16.3) han sido sobreexpresadas en sistemas homólogos (Sousa *et al.*, 2000) usando la misma cepa CECT 2413 de *T. harzianum* y, heterólogos, en *P. pastoris*. En *T. harzianum* se produce el mismo fenómeno que con BGN16.2: en glucosa no se observan proteínas a pesar de existir ARNm. Por otro lado, parece que tanto las proteínas expresadas en *P. pastoris* como en *T. harzianum* están glicosiladas.

La desaparición de actividades por adición de glucosa al medio de cultivo, o por descenso de pH (como consecuencia del crecimiento o inducido externamente) ya se han descrito previamente. En *S. cerevisiae* las actividades β -1,3- y β -1,6-glucanasa disminuyen con el pH (Del Rey *et al.*, 1979), atribuyéndoseles por ello una localización periplásmica, y al igual que en esta tesis, aumenta la actividad al tamponar el medio de cultivo. En *P. italicum* también se ha observado que actividades β -1,3- y β -1,6-glucanasa sujetas a represión catabólica se inactivan cuando el cultivo llega a pH 7 (Santos *et al.*, 1977). En el basidiomiceto QM 806, la actividad β -1,3-glucanasa desaparece rápidamente cuando se añade glucosa al cultivo (Friebe & Holldorf, 1975). En la cepa objeto de estudio de esta tesis, *T. harzianum* CECT 2413, se ha observado también que la proteína BGN13.1, una β -1,3-glucanasa, no está presente en medios a pH 3 (Rincón & Benítez, 2000). Esto no es exclusivo de las glucanasas, ya que se da también en la expresión de la quitinasa CHIT42 en *T. reesei* (Margolles-Clark *et al.*, 1996) y en *T. harzianum* CECT 2413 (Limón & Benítez, 1998), donde se relaciona la desaparición de la enzima con el descenso brusco del pH y la detección de una actividad proteasa importante. En *Acremonium persicinum*, una β -1,3-

glucanasa desaparece del cultivo cuando el pH baja de 4 o sube de 7, y parece que una serin-proteasa está implicada en su degradación (Pitson *et al.*, 1996b).

Esta acidificación, provocada por la producción de ácidos débiles durante el metabolismo de la glucosa, puede producir cambios importantes en la estructura de las proteínas dando lugar a la pérdida de la función y su desnaturalización (Jeenes *et al.*, 1991). En el caso de *T. harzianum*, un cultivo de micelio en glucosa y amonio en fase exponencial reinoculado e incubado durante 24 horas alcanza valores de pH de 2,5.

Los experimentos de western-blot indican que la proteína es detectable por inmunodetección aunque no se observa actividad en los medios con pustulan y glucosa, y muy poca en los que sólo tienen pustulan, y siendo el pH 3 o menos. Esto puede deberse a un efecto de protección del pustulan sobre la enzima. Ya fue descrito que en presencia del polímero la actividad de la enzima era óptima a 50°C, mientras que en ausencia de pustulan, la enzima se inactiva a esa temperatura (De la Cruz, *et al.*, 1995a). El mismo fenómeno se ha descrito también para otra β -1,6-glucanasa de *T. harzianum* (De la Cruz & Llobell, 1998).

En los cultivos con xilosa y lactosa se detecta un ligero aumento de actividad a pesar del pH ácido. Este fenómeno podría estar relacionado con un aumento de la capacidad de transporte, muy disminuida en *Trichoderma* cuando crece en glucosa (Kurzatkowski *et al.*, 1996), al utilizar fuentes de carbono más difícilmente asimilables como la xilosa y la lactosa, que podrían inducir la formación y secreción de algunas enzimas extracelulares. El fenómeno contrario se da con algunas fuentes de nitrógeno, ya que el uso de caseína, prolina y urea da lugar a una actividad β -1,6-glucanasa inferior a la obtenida con peptona y, sobre todo, con extracto de levadura. Dado que la cantidad de ARNm es la misma, cabía pensar que el transporte hacia el medio extracelular no está favorecido. La urea y la prolina difundirán muy fácilmente al citoplasma, mientras que la caseína sólo necesita de la síntesis y secreción de una proteasa. De la misma manera, aunque se

Discusión: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

detectó actividad proteasa ácida en los sobrenadantes de cultivos crecidos a pH ácido, no se descarta que parte del aumento de actividad β -1,6-glucanasa se deba a un desarrollo del sistema de transporte inducido a pH 6 y pH 8.

A pesar del pH, relativamente bajo, y la presencia de proteasas ácidas, los cultivos con extracto de levadura, peptona y caseína, tienen también una actividad β -1,6-glucanasa alta. Estas fuentes de nitrógeno son, probablemente, sustrato de proteasas ácidas, protegiendo a la glucanasa de la degradación. De hecho durante experimentos de sobreproducción de proteínas, se han usado frecuentemente fuentes de nitrógeno peptídicas para evitar proteólisis (Jeenes *et al.*, 1991). No podemos sin embargo descartar la posibilidad de que sólo a pH muy ácido (alrededor de pH 3) se produzcan modificaciones necesarias en la estructura de la proteína que permitan el acceso de la proteasa a los sitios de corte.

Según los experimentos de proteólisis *in vitro*, tanto el pH como una actividad proteasa aspártica dan lugar a la degradación de β -1,6-glucanasa II. El efecto de la actividad enzimática proteolítica se comprueba tratando con pepstatina o bien hirviendo el sobrenadante que contiene las proteasas: la proteína BGN16.2 se mantiene en un estado de degradación muy similar al obtenido incubando a pH ácido. El efecto del pH también es fundamental, ya que la proteína BGN16.2 se degrada incubando a pH 2,7.

4. El sistema proteolítico de *Trichoderma*

En los experimentos realizados mediante isoelectroenfoque y zimograma sobre gel de BSA se detectaron cuatro actividades proteolíticas. Dos actividades ácidas aparecen en medios con fuente de carbono fácilmente asimilables y amonio como fuente de nitrógeno, en medios con extracto de levadura o peptona, y, finalmente, en medio tamponado a pH 3. Por otro lado, tenemos una actividad neutra y otra básica, que aparecen relacionadas con estrés nutricional (medio pobre

Discusión: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

en carbono o con fuentes no fácilmente asimilables, como quitina o lactosa), o en medios con caseína como fuente de nitrógeno.

Los datos sobre proteasas en *Trichoderma* son muy escasos. Se ha purificado una proteasa básica: la codificada en *T. harzianum* por el gen *prb1* (Geremía *et al.*, 1993). Es una subtilisina de 31 kDa y pI 9,2, expresada cuando *T. harzianum* crece en quitina y paredes celulares de *R. solani*. Esta proteína podría ser, por tanto, la misma que la responsable de la actividad proteasa básica detectada en nuestra cepa en similares condiciones de cultivo. De hecho, ambas son inhibibles por PMSF. Esta proteína parece tener un papel importante en el micoparasitismo, ya que cepas que sobreexpresan el gen *prb1* son mejores agentes de control biológico contra infecciones de *R. solani* en algodón. (Flores *et al.*, 1997). Se han clonado proteasas de este tipo en varios organismos saprofiticos o patogénicos, como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (St. Leger, 1995, St. Leger *et al.*, 1997).

Recientemente se ha purificado una proteasa de *T. harzianum* CECT 2413 que se expresa cuando el hongo crece en paredes de *Colletotrichum* (Suárez *et al.*, 2000). Esta proteasa, *pral*, de 28 kDa, es una proteasa tipo tripsina.

Con respecto a las actividades ácidas, aparecen algunas reseñas en la literatura aunque no figura ninguna secuencia en los bancos de datos. Se purificó parcialmente una proteasa de sobrenadantes de *T. reesei* QM 9414 creciendo con celulosa, que tenía un pI de 4,55 (Dunne, 1982). De medios con caseína se obtuvieron tres proteasas ácidas con pIs 4,3, 4,65 y 4,85 que eran inhibidas por pepstatina, de lo que se deduce que eran aspartil-proteasas. Haab *et al.*, (1990) purificaron parcialmente otra proteasa ácida (42 kDa, pI de 4;3) de un medio con celulosa como fuente de carbono, aunque parece ser una aspartil-proteasa de una clase insensible a pepstatina (North, 1982).

Discusión: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

También se ha purificado y cristalizado una proteasa aspártica, sensible a pepstatina A de *T. reesei*, llamada trichodermapepsina (Pitts, 1992). El gen fue clonado en *T. reesei* QM6a (Mäntylä *et al.*, 1994).

Las actividades proteasa ácidas detectadas en *T. harzianum* CECT 2413 se inhiben por pepstatina. Esto las hace adscribibles a las pepsinas, un grupo de proteasas muy relacionadas entre sí, y entre las que se encontrarían las detectadas y purificadas en *T. reesei*.

Son muchas las referencias que hay en la literatura a proteasas que degradan proteínas sobreproducidas (Verdoes *et al.*, 1995). Una actividad proteasa ácida parece ser la responsable de la degradación de CHIT42 en *T. reesei* (Margolles-Clark *et al.*, 1996). Las proteasas son también las causantes de la degradación observada en la producción de celulasas en *T. reesei* (Hagspiel *et al.*, 1989) y en los anticuerpos producidos en la misma cepa (Nyyssönen *et al.*, 1993). En *A. persicinum* una serin-proteasa proteoliza una β -1,3-glucanasa (Pitson *et al.*, 1996). De todos estos datos se infiere la importancia que tiene la obtención de cepas disruptas para genes de proteasas en la producción de proteínas (Van den Hombergh *et al.*, 1997b, Mäntylä *et al.*, 1998). La disrupción de una proteasa ácida en *A. awamori* provoca un gran aumento en la producción de quimosina (Berka *et al.*, 1990, Dunn-Coleman *et al.*, 1991) o permite la producción de taumatina en *A. awamori* (Moralejo *et al.*, 2000). En *A. niger* también se han obtenido cepas disruptas para las dos proteasas extracelulares más importantes, *pepA* y *pepB*, perdiendo así la cepa casi totalmente su actividad proteasa ácida, y consiguiendo la ausencia total de degradación de PELB (Van den Hombergh *et al.*, 1997a). En *P. roqueforti* se han obtenido mutantes en la regulación de la proteasa *aspA* que son adecuados para la producción de proteína (Durand-Poussereau & Fevre, 1996). En *T. reesei* se han obtenido cepas disruptas para una proteasa ácida (Pitts, 1992, Mäntylä *et al.*, 1994, Mäntylä *et al.*, 1998), que sufren una pérdida del 94% de esta actividad, que descendió hasta el nivel de la cepa mutada por UV ALKO 2221. Por

tanto, la disrupción de proteasas ácidas es una estrategia válida en hongos filamentosos y en el género *Trichoderma* en particular para aumentar los niveles de producción de proteínas.

5. Clonación y regulación del gen de la proteasa PAPA

Utilizando oligos correspondientes a secuencias conservadas entre varias pepsinas de hongos filamentosos se obtuvo mediante PCR un fragmento con una secuencia muy similar (usando el algoritmo BLASTX) a las aspartil-proteasas fúngicas. Posteriormente, ese fragmento permitió obtener un clon genómico completo que incluía 1 kpb de promotor.

La secuencia de la proteína PAPA deducida a partir de la de ADN se ajusta perfectamente a la familia de las pepsinas: son proteínas con un pI de 4-5 e incluso un peso molecular similar: en torno a los 30-40 kDa. Aunque se conocen pepsinas glicosiladas (Aikawa *et al.*, 1990), parece que PAPA no tiene ninguna señal de glicosilación. La estructura de la molécula está dividida en dos lóbulos, localizándose el sitio activo entre ambos (Rawlings & Barrett, 1995). Cada lóbulo contiene uno de los residuos de aspártico necesarios para la actividad. Esto las diferencia de las retropepsinas, que contienen solamente un lóbulo, lo que hace pensar que las pepsinas surgieron por duplicación génica. Las pepsinas como la PAPA tienen los aspárticos responsables del centro catalítico dentro del motivo Asp-X-Gly, donde X puede ser serina o treonina. En PAPA se observan dos dominios Asp-Tre-Gly. Hay una marcada conservación de los residuos de cisteína en las pepsinas, ya que existen tres puentes disulfuro: uno después del primer Asp catalítico, otro precediendo al segundo, y otro cerca del extremo carboxilo de la proteína (Rawlings & Barrett, 1995). La PAPA posee, sin embargo, sólo dos cisteínas. La proteína PAPA posee un peso molecular de 42 kDa, un pI de 4,4-4,6, y el resto de las características deducidas de la secuencia la engloba como una pepsina, al igual que la trichodermapepsina de *T. reesei* (Pitts, 1992). Las pepsinas

Discusión: Sobreexpresión de la proteína BGN16.2

son, en mayor o menor medida, inhibibles por pepstatina (Rawlings & Barrett, 1995), aunque algunos autores han descrito pepsinas no inhibibles (North, 1982). Los experimentos realizados con la proteína superproducida indican que es inhibible por pepstatina.

El gen se reprime por glucosa y glicerol y se desreprime ligeramente cuando no hay glucosa en el medio. La presencia de quitina no induce la expresión. En cuanto a las fuentes de nitrógeno, el extracto de levadura o la caseína y, en menor medida, la peptona inducen la expresión de *papA*. El pH no impide la represión por glucosa, por lo que parece haber una jerarquía de controles en la que la regulación por nutrientes primaria sobre el pH.

Tanto el glicerol como la glucosa reprimían la expresión del gen, incluso en presencia de caseína en el caso del glicerol. Esto, unido a la ausencia de cajas CreA en el promotor del gen *papA*, nos hace pensar en la existencia de un mecanismo de regulación distinto al descrito como represión por glucosa (Ronne, 1995). Esta posibilidad ya ha sido apuntada por otros autores (Espeso *et al.*, 1993).

En los experimentos de Northern-blot con ARN extraído de micelio cultivado en glucosa, y con exposiciones muy largas se ha observado un ARNm que hibrida con *papA*. Esto indica que esta proteasa u otra relacionada está presente en los medios con glucosa. Por otra parte, se ha intentado purificar alguna actividad proteasa presente en los medios de cultivo en los que se degrada la proteína BGN16.2. Al realizar un cromatofoco sobre un sobrenadante muy concentrado de un cultivo en glucosa no se purificaron proteasas con el pI esperado a partir de los isoelectroenfocos y zimogramas (pI 3,5-4), y correspondiente a las dos actividades observadas en los isoelectroenfocos y zimogramas de otros sobrenadantes. Sin embargo, sí se separó una actividad proteasa con un pI de 4,5-4,7, aunque no totalmente y en una cantidad muy pequeña. Si esta proteasa, presente en cultivos con glucosa y amonio, es PAPA u otra pepsina muy similar aún resta por ser comprobado.

Muchas pepsinas tienen un patrón de regulación muy similar a PAPA. El gen *pepA* de *A. niger* (Berka *et al.*, 1990) que codifica una proteína muy similar a PAPA, se reprime fuertemente por amonio, de manera que si éste falta o se sustituye por un fuente de nitrógeno peptídico (BSA, caseína o elastina) el gen se expresa a niveles muy altos. En cuanto al carbono, *pepA* está reprimido por glucosa, dereprimiéndose en presencia de glicerol o en ausencia de carbono en el medio de cultivo. Finalmente, pHs básicos son capaces de reprimir completamente la expresión inducida con fuentes peptídicas de nitrógeno (Jarai & Buxton, 1994). La proteasa *aspA* de *P. roqueforti* se secreta cuando el amonio del cultivo se reemplaza por caseína (Gente *et al.*, 1997). De la misma manera que para PAPA, el pH no es suficiente para permitir la inducción de *aspA*, ya que en cultivos con pHs ácidos en presencia de amonio no se produce la proteasa. Por otra parte, la proteasa no se produce en cultivos con caseína cuando el pH es 7,5, ya que a ese pH la proteasa no es madurada, no se producen los péptidos inductores y el gen se reprime (Gente *et al.*, 2001). Este mismo fenómeno parece darse con la proteasa PAPA, ya que no se observa expresión en caseína tamponada a pH 8. La represión, pues, prima sobre la inducción tanto en lo que respecta a la fuente de nitrógeno (represión por amonio) como al pH (represión en condiciones de pH básico). Este comportamiento se debe a la presencia de cajas AreA y PacC en el promotor de *aspA*, algunas de las cuales son funcionales (Gente *et al.*, 1997). *T. harzianum* CECT 2413, al igual que otros hongos, acidifica mucho el medio en presencia de glucosa y amonio, por lo que separar el efecto del pH ácido y estos dos metabolitos resulta difícil a la hora de interpretar la regulación. Es posible que el efecto del pH ácido (un posible inductor) no pueda primar sobre el amonio o la glucosa (represores), pues el pH parece ser consecuencia del metabolismo de ambos.

Hay otras pepsinas con un patrón de regulación completamente distinto. La proteasa *papA* de *Podospora anserina* se expresa principalmente en condiciones de escasez de carbono pero no de nitrógeno (Paoletti *et al.*, 1998). Esta proteasa

parece relacionada con proceso de diferenciación, lo que puede ser fundamental a la hora de determinar su regulación.

6. La proteasa PAPA en la sobreexpresión de BGN16.2

Para comprobar la posible influencia de la proteasa PAPA sobre la estabilidad de BGN16.2 se transformó la cepa CECT 2413 y la cepa B4 (que sobreexpresa *bgn16.2*) con un vector que permitía sobreexpresar la proteasa. En medios con extracto de levadura, la proteasa está presente en grandes cantidades, aunque la BGN16.2 sigue presente en el medio de cultivo. El mismo fenómeno se da creciendo en glucosa y amonio a pH 6. Ni siquiera incubaciones de los extractos dan lugar a una degradación de BGN16.2 inhibible por pepstatina (datos no mostrados).

Ya se ha sugerido que existen dos factores responsables de la hidrólisis de BGN16.2: pH y proteasa. Sin embargo, la PAPA también parece inestable a pH ácido, ya que no parece estar presente en los cultivos con glucosa y amonio. Por este hecho y por la ausencia casi total de ARNm de *papA* en cultivos de glucosa y amonio, la proteasa PAPA no parece ser la causante de la degradación de BGN16.2.

En esta tesis no se ha logrado la disrupción de la proteasa *papA*. Como no parece que esto se deba a que el gen sea esencial, es posible que sea necesario modificar la estrategia utilizada. Una posibilidad es obtener los protoplastos a partir de micelio crecido en las condiciones en las que se expresa el gen, ya que, estructuras relajadas de la cromatina permitirían el acceso de la maquinaria de recombinación, incrementando la frecuencia de transformadas con el gen interrumpido.

CAPÍTULO 2

AISLAMIENTO DE GENES REGULADOS POR pH

INTRODUCCIÓN

1. La regulación del micoparasitismo

En el primer capítulo de esta tesis hemos visto cómo la sobreexpresión de una β -1,6-glucanasa conduce a la obtención de cepas de *T. harzianum* con mayor actividad antifúngica. Tanto la sobreexpresión de una sola enzima (Flores *et al.*, 1997, Migueli *et al.*, 1998, Limón *et al.*, 1999, Rincón & Benítez, 2000) como el aumento de los niveles de varias enzimas simultáneamente por un defecto en la secreción (Rey *et al.*, 2001) lleva a obtener cepas que son mejores agentes de control contra hongos fitopatógenos. Sabemos, por tanto, que las enzimas están implicadas en el micoparasitismo, al menos en los modelos mencionados, pero aún no conocemos cuál es la secuencia de hechos que desencadenan como respuesta la producción de estas enzimas.

Según se ha descrito hasta ahora, alguna actividad hidrolítica de *T. harzianum* —se ha propuesto que una quitinasa—, parece liberar un tipo de molécula de las paredes del hongo hospedador, probablemente de alto peso molecular, que es responsable de la inducción de los genes que codifican las hidrolasas de paredes celulares (Cortes *et al.*, 1998, Mach *et al.*, 1999, Zeilinger *et al.*, 1999, Kullnig *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta el momento, la naturaleza de esa molécula inductora es desconocida. Todo apunta a que puedan ser oligómeros de quitina, aunque con los disponibles comercialmente nunca se ha mimetizado una respuesta de micoparasitismo (Mach *et al.*, 1999, Zeilinger *et al.*, 1999). Sin embargo, sí se ha obtenido una rápida inducción del promotor de la quitinasa *chit33* usando N-acetilglucosamina (Dana *et al.*, 2001), por lo que quizás estamos ante una respuesta secuencial, dependiente de distintos inductores para la expresión de distintas enzimas a lo largo del tiempo, como han descrito algunos autores (Haran *et al.*, 1996a)

Introducción: Aislamiento de genes regulados por pH

Se ha descrito en los promotores de la quitinasa *chit42* y de la proteasa *prb1* de una cepa de *T. harzianum*, una secuencia de ADN que podría estar implicada en una respuesta como el micoparasitismo, aunque no existe ningún dato experimental que indique que esa secuencia sea funcional o se una a ella una proteína (Cortes *et al.*, 1998).

El análisis de cuatro promotores de genes pertenecientes a enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* CECT 2413 revela la existencia de secuencias consenso para factores tipo CreA (represión por glucosa), AreA (regulación por nitrógeno), STRE (regulación en condiciones de estrés) y PacC (regulación por pH) (Fig. 1). Se han hallado además elementos consenso para otras proteínas reguladoras implicadas en esporulación y otros procesos morfogénéticos. En este trabajo sólo se discutirán las mencionadas anteriormente.

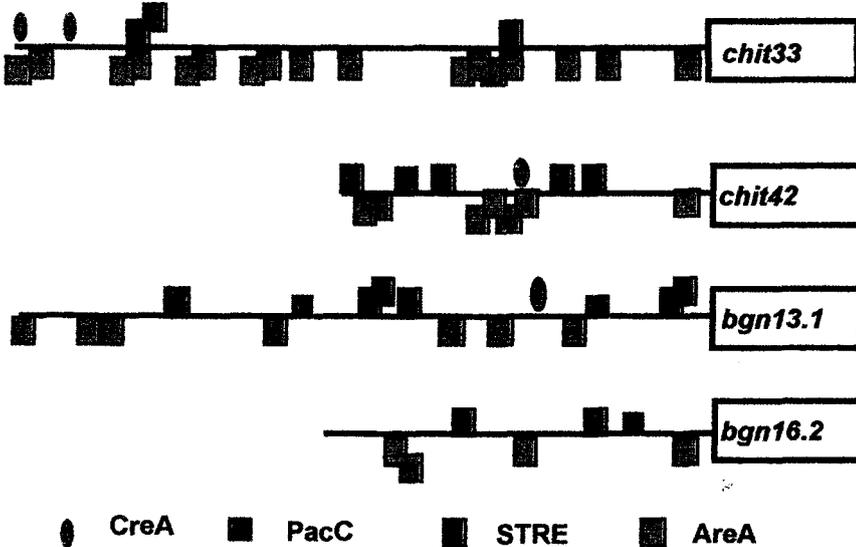


Fig. 1: Esquema de la disposición de algunas de las cajas potencialmente implicadas en la regulación de los genes que codifican las enzimas que tienen un papel importante en el micoparasitismo.

2. La represión por glucosa mediada por CreA

Los hongos filamentosos gozan de una versatilidad metabólica sólo comparable a la de las bacterias. Sin embargo, han desarrollado un mecanismo que garantiza un mínimo gasto energético en la síntesis de las proteínas encargadas de proveer dicha versatilidad: la represión por glucosa. Si el organismo puede disponer de glucosa no sintetizará las enzimas encargadas de metabolizar otras fuentes de carbono. Esto se realiza a través de la proteína codificada por el gen *creA*, que reprime la expresión los promotores que codifican esas enzimas.

El gen *creA* ha sido clonado en *A. nidulans* (Dowzer & Kelly, 1991), en *A. niger* (Drysdale *et al.*, 1993), en *T. reesei* (Strauss *et al.*, 1995, Takashima *et al.*, 1996a, Ilmén *et al.*, 1996a), en *T. harzianum* (Ilmén *et al.*, 1996a), en *Metarhizium anisopliae* (Screen *et al.*, 1997), en *Humicola grisea* (Takashima *et al.*, 1998), en *Sclerotinia sclerotiorum* (Vautard *et al.*, 1999), en *B. cinerea* y en *G. fujikuroi* (Tudzynski *et al.*, 2000). En todos los casos donde se ha analizado, el gen *creA* –y sus homólogos- codifica una proteína con dos dedos de zinc C_2H_2 , que se unen a una secuencia 5'-SYGGRG-3', que suele presentarse en parejas separadas por unos pocos pares de bases, para reprimir la expresión del gen al que pertenezca ese promotor (Kulmburg *et al.*, 1993, Cubero & Scazzocchio, 1994). El caso mejor estudiado es el de la proteína Mig1, que es la responsable de la represión por glucosa en *S. cerevisiae* (Ronne, 1995, Gancedo, 1998)

Se ha descrito que diversas hidrolasas de polímeros están reprimidas por proteínas tipo *creA* (Ruijter & Visser, 1997, Ruijter *et al.*, 1997), como la celobiohidrolasa CBH1 (Ilmén *et al.*, 1996b, Takashima *et al.*, 1996b) y la xilanasas 1 (Mach *et al.*, 1996), ambas de *T. reesei*, la xilanasas A (Orejás *et al.*, 1999) y una arabinofuranosidasa, de *A. nidulans* (Gielkens *et al.*, 1999). La obtención de mutantes *creA* se presenta, por tanto, como una estrategia inmediata para obtener cepas desreguladas en la producción de enzimas hidrolíticas de polímeros. Sin embargo, los alelos nulos *creA* provocan graves problemas en el crecimiento del

Introducción: Aislamiento de genes regulados por pH

organismo (Dowzer & Kelly, 1991). Frente a esto, la obtención de alelos nulos parciales como *creA*^{d30} (Arst *et al.*, 1990) o la expresión de un ARNm antisentido de *creA* (Bautista *et al.*, 2000) han demostrado en *A. nidulans* la utilidad de la manipulación de los factores de transcripción y su regulación para la obtención de cepas útiles en biotecnología. Un ejemplo claro de esto es la cepa RutC30 de *T. reesei*, un superproductor de celulasas que posee un alelo *cre1* truncado (Ilmén *et al.*, 1996a).

El único trabajo realizado con el promotor de un gen (*chit42*) implicado en el micoparasitismo indica la participación del factor Cre1 en la regulación de dicho gen (Lorito *et al.*, 1996). Sin embargo, y aunque en la casi totalidad de los genes implicados en la hidrólisis de paredes celulares se ha observado una fuerte desrepresión en cultivos creciendo con poca glucosa (Benítez *et al.*, 1998), se ha comprobado que 1) genes como *bgn13.1* sólo se inducen por quitina pero no se desreprimen en ausencia de glucosa y 2) el glicerol se comporta como una fuente de carbono represora (Carsolio *et al.*, 1994, García *et al.*, 1995, Lora *et al.*, 1995, Dana *et al.*, 2001) lo que parece contradecir la intervención de un único factor de transcripción tipo CreA en los genes implicados en el micoparasitismo, al menos de la manera clásica (Ronne, 1995, Gancedo, 1998). El mismo fenómeno se ha comprobado en el gen *ipnA*, que codifica la isopenicilin-N-sintetasa de *A. nidulans* (Espeso *et al.*, 1993). Por otro lado, en algunos promotores de las hidrolasas de *T. harzianum* no hay sitios consenso CreA, y cuando los hay, éstos no están dispuestos de manera adecuada. Sin embargo, esos genes están en su mayoría reprimidos por glucosa. Es posible, por tanto, como se ha apuntado para otros sistemas (Espeso *et al.*, 1993), que exista una forma independiente de CreA de provocar la represión por glucosa.

3. Regulación positiva del metabolismo del nitrógeno mediada por AreA

Los hongos utilizan como fuente de nitrógeno preferente el amonio, la glutamina o el glutámico. Sin embargo, cuando éstos no están disponibles, son capaces de usar compuestos tan distintos como las proteínas y sus aminoácidos, el nitrato y el nitrito, purinas, amidas, etc. Los genes implicados en la asimilación de estas moléculas –permeasas y enzimas catabólicos- están sujetos a represión cuando alguna de las fuentes primarias de nitrógeno están presentes. La inducción de estos genes cuando son necesarios es doble: general y específica de ruta. En el primer caso, la desrepresión de esos genes está mediada por reguladores positivos del tipo de AreA en *A. nidulans* (Kudla *et al.*, 1990), Nit-2 en *N. crassa* (Fu & Marzluf, 1990), Nre en *P. chrysogenum* (Haas *et al.*, 1995), Nut-1 en *M. grisea* (Froeliger & Carpentier, 1996), y AreA en *G. fujikuroi* (Tudzynski *et al.*, 1999), entre otros.

Estas proteínas reguladoras son miembros de la familia de factores de transcripción GATA, y todos poseen en su secuencia un dominio de unión a ADN consistente en un motivo de dedo de zinc C₂C₂ con un lazo central de 17 aminoácidos. Mediante este dominio se unen a la secuencia 5'-HGATAR-3' (Ravagnani *et al.*, 1997), de manera que, dos o más elementos GATA en la misma dirección o en la opuesta y separados por unos 30 pb constituyen un sitio de unión a Nit-2 (Chiang & Marzluf, 1994), aunque esto no es extensible a otras especies (Ravagnani *et al.*, 1997).

En algunos organismos patógenos de plantas y de animales se ha comprobado que el gen *areA* (o sus homólogos) cumple alguna función en el desarrollo de la acción patogénica. Así, mutantes *areA* de *Aspergillus fumigatus* provocan en ratones una aspergilosis pulmonar en un grado inferior al silvestre (Hensel *et al.*, 1998). El gen no parece, sin embargo, ser esencial ya que los mutantes siguen siendo patógenos. El promotor del gen de avirulencia *avr9* de *Cladosporium fulvum* tiene varias cajas GATA. Se ha comprobado que, si *avr9* se

expresa en *A. nidulans*, el promotor se encuentra regulado por AreA, ya que no se expresa en cepas defectivas en este regulador (Snoeiijers *et al.*, 1999). Un caso interesante es el de *M. grisea*. Cepas mutantes que no expresan el gen homólogo a *areA*, *NUT1*, no tienen ninguna alteración en su respuesta patogénica sobre el arroz (Froeliger & Carpentier, 1996). Sin embargo, se han clonado dos genes, *NPR1* y *NPR2*, que son esenciales para la asimilación de diversas fuentes de nitrógeno y también son indispensables para que *M. grisea* desarrolle la capacidad de infectar al arroz (Lau & Hamer, 1996).

Aunque en los promotores de los genes de *T. harzianum* implicados en el micoparasitismo existen bastantes cajas GATA, no se ha determinado aún si son funcionales y, por tanto, si el nitrógeno juega un papel importante en el desarrollo de la respuesta antifúngica de *Trichoderma*. Se ha detectado expresión del gen de la quitinasa *chit33* de *T. harzianum* en medios donde se ha reducido la concentración de nitrógeno cien veces (Dana *et al.*, 2001). En la mayoría de los casos, sin embargo, es probable que este papel quede oculto por la utilización de amonio como fuente de nitrógeno en todos los experimentos, en lugar de, por ejemplo, nitrato. No disponer de mutantes impide comprobar si los genes implicados en la hidrólisis de paredes celulares de hongos, están controlados por *areA*, uniendo de esta manera la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno con el desarrollo de una respuesta agresiva como el micoparasitismo, como ocurre en otros sistemas (Lau & Hamer, 1996).

4. La respuesta a estrés mediada por elementos STRE

Las células, cuando son sometidas a algún tipo de estrés ambiental, desarrollan una respuesta temprana, que no requiere la síntesis de nuevas proteínas, y que implica cambios en el metabolismo. Estos cambios están mediados por cadenas de transducción de señales que inducen una alteración en el patrón de

expresión génica de la célula. La acción desarrollada por las proteínas sintetizadas *de novo* constituye la respuesta tardía a aquel estrés ambiental.

En levaduras se conoce que las células expuestas a estrés suave desarrollan tolerancia no sólo contra dosis de estrés más altas, sino contra estrés causado por agentes de otra naturaleza (Ruis & Schüller, 1995). Esto apunta hacia la existencia de un mecanismo general que integra las respuestas hacia los diferentes tipos de estrés. En *S. cerevisiae* existen al menos dos proteínas que inducen la transcripción de genes implicados en la respuesta a estrés. Estas dos proteínas, Msn2p y Msn4p, se unen en los promotores a los elementos 5'-WAGGGG-3', conocidos como cajas STRE (Estruch & Carlson, 1993, Martínez-Pastor *et al.*, 1996, Siderius & Mager, 1997). Los genes *MSN2* y *MSN4* codifican dos proteínas reguladoras que contienen dos dedos de cinc C_2H_2 en el extremo carboxilo (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). Aunque ambos genes son necesarios, parece que *MSN2* tiene un papel más importante, realizando *MSN4* quizás una función redundante (Görner *et al.*, 1998). Sin embargo, la inducción completa de los genes implicados en la respuesta a estrés requiere de la participación de ambos.

Entre los agentes causantes de estrés en levaduras están la ausencia de nutrientes, las temperaturas extremas, la alta osmolaridad, el estrés oxidativo, el pH bajo, los ácidos débiles, el etanol, etc. Todos provocan, a través de la interacción entre Msn2p y Msn4p y los elementos STRE, la inducción de genes que codifican proteínas de choque térmico, del metabolismo de la trealosa, etc. que serán los responsables de la resistencia a un estrés severo (Ruis & Schüller, 1995).

Muchos de esos agentes de estrés actúan a nivel de la membrana, aumentando la permeabilidad y provocando cambios en el potencial de membrana, que puede ser la señal que desencadene la respuesta (Moskvina *et al.*, 1999). Así, mientras que unas condiciones de crecimiento favorables activan la cascada de señales Ras-AMPC y la protein kinasa A (PKA) (Colombo *et al.*, 1998), la aparición de factores de estrés conduce a la inactivación de esta cascada y a la

disminución en los niveles de la proteína PKA (Siderius & Mager, 1997). Estos cambios provocan el paso de Msn2p al núcleo y la activación de los genes de respuesta a estrés (Görner *et al.*, 1998).

Los promotores de las hidrolasas de *T. harzianum* poseen cajas STRE (Fig.). Podemos pensar, por tanto, que *Trichoderma* cuando detecta alguna situación de estrés, por ejemplo la falta de una fuente adecuada de carbono o de nitrógeno, desencadena una respuesta que consiste en la secreción de hidrolasas como las quitinasas y las glucanasas. De hecho, se ha descrito que tanto la quitinasa *chit42* en *T. atroviride* como *chit33* de *T. harzianum* se expresan en diversas condiciones de estrés tales como choque térmico, alta presión osmótica o etanol (Mach *et al.*, 1999, Dana *et al.*, 2001). El gen *nagl* de *T. atroviride*, que codifica una N-acetilglucosaminidasa implicada en micoparasitismo (Peterbauer *et al.*, 1996) posee también en su promotor cajas STRE, cuya movilidad en un gel disminuye al tratar con extractos nucleares, lo que sugiere la existencia de algún elemento similar a Msn2p o Msn4p (Peterbauer *et al.*, 2000). Por otro lado, detergentes que desestabilizan la membrana, y que en *S. cerevisiae* desencadenan la internalización de Msn2p y, por ende, la activación de genes de respuesta a estrés, inducen en *T. reesei* un aumento de los niveles de hidrolasas extracelulares (Kruszewska *et al.*, 1990). Esto podría ser un indicio, no sólo del aumento de glicosilación de las proteínas, como postulan los autores, sino de un aumento de la transcripción causada por elementos STRE.

Aunque está por demostrar tanto la existencia de tales elementos en *Trichoderma* como su implicación en el micoparasitismo, es tentador pensar en la obtención de cepas “hiperestresadas” que produzcan altos niveles de hidrolasas y resistan condiciones adversas bien por superproducción de los factores homólogos a Msn2p y Msn4p, bien por la obtención de mutantes parciales (los alelos nulos suelen ser letales) en la actividad de la PKA.

5. Expresión génica regulable por el pH a través de PacC

Los hongos filamentosos son capaces de crecer en intervalos amplios de pH. Para ello, deben controlar de manera eficiente su homeostasis, evitando cambios drásticos en el pH intracelular y adaptando su maquinaria enzimática extracelular a los requerimientos del medio.

En *A. nidulans* se ha caracterizado extensamente un sistema de regulación génica basada en el pH externo (Denison, 2000). El responsable final de dicha regulación es un factor de transcripción llamado PacC (Tilburn *et al.*, 1995). Esta proteína posee un dominio de unión a ADN con tres dedos de zinc C_2H_2 , y que tiene una afinidad muy alta por el elemento 5'-GCCARG-3' (Tilburn *et al.*, 1995, Espeso *et al.*, 1997). Cuando el pH del medio es alcalino, se transmite una señal a través de seis genes *pal* (Denison *et al.*, 1995, 1998; Negrete-Urtasun *et al.*, 1997, 1999) aunque el papel de cada uno de ellos aún no está determinado. El producto de uno de estos genes, o de algún otro aún sin identificar, elimina un dominio inhibitorio de PacC (Orejas *et al.*, 1995, Mingot *et al.*, 1999) que previamente ha cambiado su conformación en respuesta al pH para permitir el acceso de la proteasa (Espeso *et al.*, 2000). PacC ya procesado activará genes que se deben expresar a pH alcalino e inhibirá los que se expresan sólo a pH ácido.

Sistemas homólogos –aunque con diferencias entre unos y otros– se han caracterizado en *A. niger* (MacCabe *et al.*, 1996), *P. chrysogenum* (Suárez & Peñalva, 1996), *C. albicans* (Ramón *et al.*, 1999, Porta *et al.*, 1999, Davis *et al.*, 2000), *Yarrowia lipolytica* (Lambert *et al.*, 1997, Tréton *et al.*, 2000), y *S. cerevisiae* (Li & Mitchel, 1997, Denison *et al.*, 1998, Tréton *et al.*, 2000). Se ha descrito asimismo que se puede regular una respuesta a cambios en el pH de una forma independiente a pacC, al menos en *C. albicans* (Davis *et al.*, 2000).

Entre los genes controlados por el pH se ha descrito: los de permeasas de GABA y fosfatasa ácida y alcalina (Caddick *et al.*, 1986), el de una proteasa alcalina (Tilburn *et al.*, 1995) en *A. nidulans*, y el gen que codifica una proteasa

Introducción: Aislamiento de genes regulados por pH

alcalina en *Y. lipolytica* (Lambert *et al.*, 1997), además de los implicados en la producción de antibióticos en *A. nidulans* (Espeso *et al.*, 1993, Then Berg & Brakhage, 1998), y en *P. chrysogenum* (Suárez & Peñalva, 1996), en la producción de xilanasas y arabinofuranosidasas en *A. nidulans* (MacCabe *et al.*, 1998, Gielkens *et al.*, 1999), y en la filamentación en *C. albicans* (Ramón *et al.*, 1999, Davis *et al.*, 2000), entre otros casos.

Existen bastantes indicios de que *T. harzianum* posee un sistema de regulación por pH similar a los descritos en otros hongos filamentosos. Cuando *T. harzianum* crece utilizando glucosa y amonio, acidifica el medio rápidamente (Fig. 2). Sin embargo, si utiliza paredes celulares o sus componentes básicos (quitina y polímeros de glucosa) el pH del cultivo se mantiene en los valores iniciales (neutros o ligeramente alcalinos según el experimento). Si se analiza el perfil de proteínas extracelulares secretadas en un cultivo a pH ácido y básico se observan grandes diferencias (Delgado-Jarana *et al.*, 2000b). Por otro lado, la mayoría de las quitinasas y glucanasas secretadas por *T. harzianum* tienen un pH óptimo neutro o ligeramente alcalino. Otras proteínas, como una proteasa ácida, se detectan sólo a pH ácido (ver Capítulo 1 de esta tesis, Delgado-Jarana *et al.*, 2000a). Finalmente, algunos genes de hidrolasas de *T. harzianum* poseen cajas PacC en sus promotores, aunque no se ha analizado aún si la expresión de dichos genes está regulada por el pH.

En la naturaleza la condición habitual para *Trichoderma* es hambre de nutrientes, sobre todo carbono y nitrógeno, lo que provoca una situación de estrés permanente. El elemento cambiante y, por tanto, más importante regulador de la expresión génica debería ser el pH. Esto subordina el interés por la regulación mediada por los elementos tipo AreA, CreA y STRE frente al estudio de regulación mediada por PacC, o elementos similares. Por tanto, en esta tesis se ha realizado la búsqueda de genes regulados por pH mediante la técnica conocida por "Differential Display". Se optó por esta técnica frente a otras como escrutinio diferencial o

Introducción: Aislamiento de genes regulados por pH

hibridación sustractiva porque permitía el aislamiento de genes independientemente de la cantidad de ARNm presente en la célula. Se podía así realizar un escrutinio bastante amplio de genes regulados por el pH del medio.

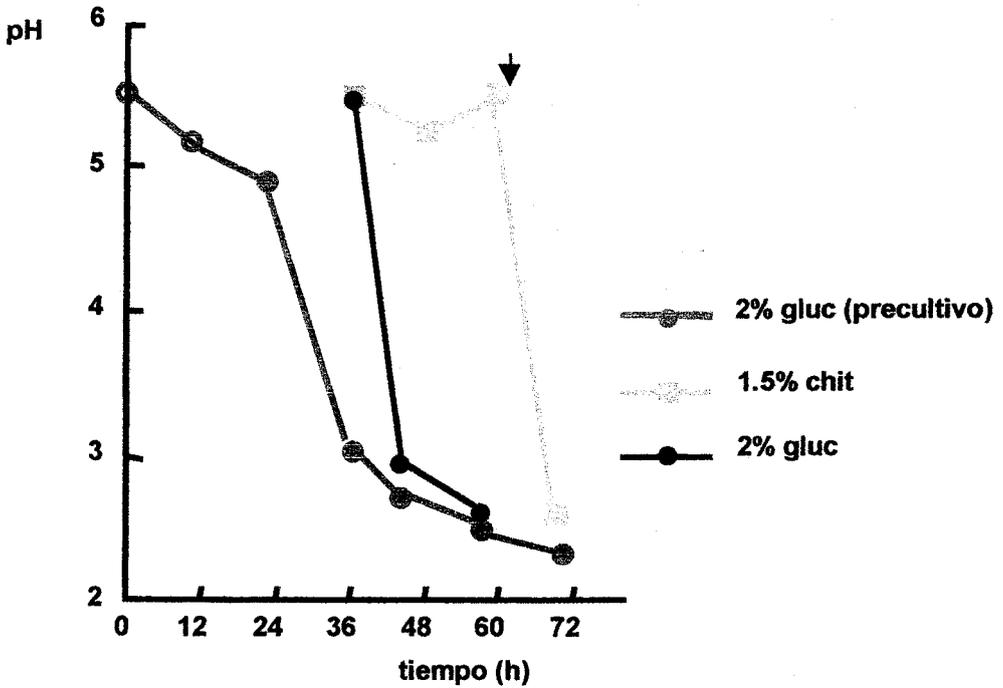


Fig. 2: Evolución del pH de un cultivo. A las 0 h se inocula un cultivo con glucosa. A las 36 h la mitad de ese cultivo se filtra y se lava, inoculándose en dos medios, uno con glucosa como fuente de carbono y otro con quitina. A las 24 h, se añade glucosa al 2 % al cultivo con quitina

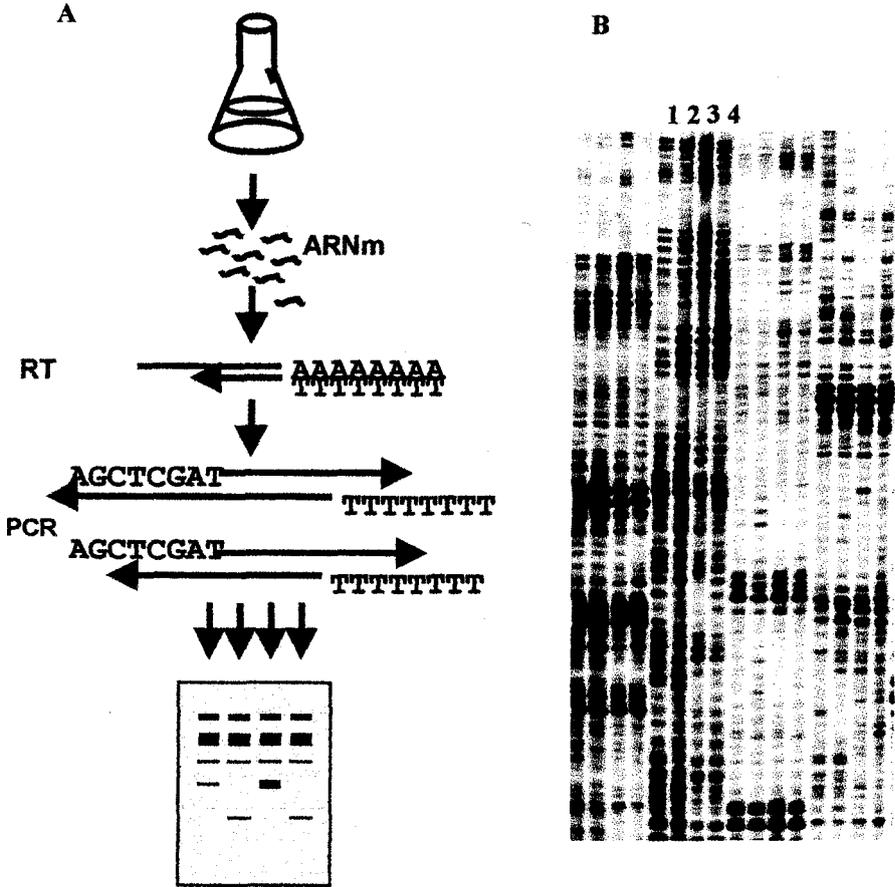


Fig. 3: A) Esquema general del DDRT-PCR. De forma resumida, de un cultivo se extrae ARN total, que es retrotranscrito usando un oligo-dT. Los ADN de una cadena obtenidos, son amplificados y sintetizados en doble cadena mediante PCR usando el mismo oligo-dT y un oligonucleótido arbitrario. Los fragmentos obtenidos son separados en un gel desnaturizante de poliacrilamida. B) Aspecto de una película Kodak BioMax MR donde se ha revelado un gel desnaturizante de acrilamida en el que se han separado fragmentos obtenidos por DDRT-PCR de cuatro condiciones distintas numeradas como 1, 2, 3 y 4.

RESULTADOS

1. Aislamiento de genes regulados por pH

Con el fin de conocer qué genes están regulados por el pH del medio en *T. harzianum*, se realizó la técnica conocida como "Differential Display". Como condiciones de cultivo se utilizaron las cuatro combinaciones resultantes de emplear glucosa al 2 % y al 0,2 % a pH 3 (tamponado con citrato) y a pH 6 (tamponado con MES-KOH). De esta manera, se podrían aislar, entre otros, genes que estuvieran reprimidos por glucosa y cuya expresión se desreprimiera por la falta de este metabolito. Además, así se evitaba que, en nuestro intento de clonar genes regulados por pH, nos encontráramos con la situación de que existiera una jerarquía de controles de modo que la represión por glucosa –o la desrepresión– primaran sobre el efecto del pH, como ocurre con el gen *pcbC* en *P. chrysogenum* (Suárez & Peñalva, 1996).

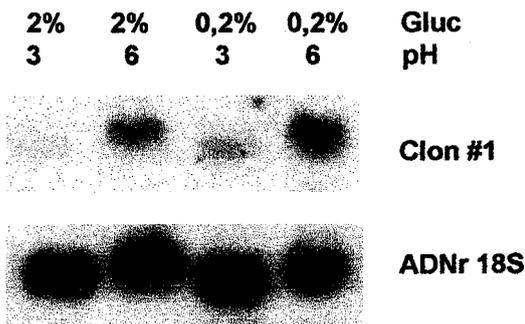


Fig. 4: Northern-blot realizado con ARN de *T. harzianum* extraído tras ser cultivado en las condiciones de glucosa y pH indicadas durante 8 horas. Previamente, el cultivo había crecido durante 40 horas en un medio sin tamponar y con glucosa al 2 %. Como sonda se utilizó, en el panel superior, el fragmento del clon #1 obtenido del DDRT-PCR; y en el panel inferior, y como control de carga, se utilizó el ADNr 18S de rábano.

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

Siguiendo el esquema que se presenta en la figura 3, se obtuvo ARN de los micelios crecidos en las cuatro condiciones indicadas tras incubarlos durante 8 h. Previamente, los micelios habían sido cultivados en un medio con glucosa al 2 % y sin tamponar. Las bandas que muestran claramente una expresión diferencial en el gel son recortadas, reamplificadas, clonadas y secuenciadas. De entre los trece clones obtenidos, en esta tesis se analizaron dos de ellos.

2. Caracterización del clon #1

El clon #1, aislado como se ha descrito, tenía una expresión más alta a pH 6 que a pH 3, siendo esta expresión ligeramente más alta en condiciones de desrepresión por falta de glucosa en el medio de cultivo (Fig. 4). Con el fragmento obtenido se identificó un clon de ADNc a partir de una genoteca realizada en

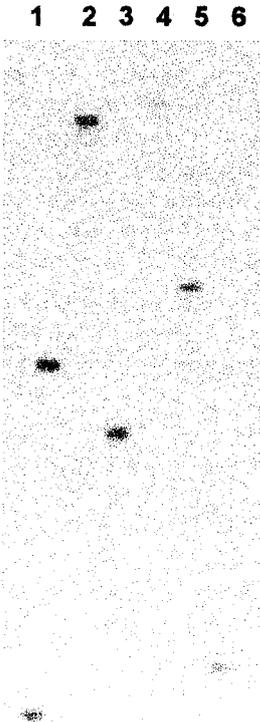


Fig. 5: Southern-blot del clon #1 realizado sobre ADN genómico de *T. harzianum* cortado con las siguientes enzimas: *XhoI* (1), *XbaI* (2), *ClaI* (3), *BamHI* (4), *HindIII* (5), y *SacI* (6). Se utilizó como sonda el ADNc del clon #1.

λZAPII[®]. La secuencia mostró una ORF de 548 aminoácidos en un fragmento de ADN de unas 1850 pb. Mediante PCR de una escisión en masa de la genoteca se obtuvo una banda perteneciente al extremo 5' que completaba la secuencia.

TABLA 2.1. Similaridad (%) de la secuencia de la proteína codificada por el clon #1 obtenida por el algoritmo BLAST.

Nº acceso	Organismo	%	Observaciones
AJ00871	<i>Scomber japonicus</i>	30	L-amino ácido oxidasa
AF027868	<i>Bacillus subtilis</i>	24	L-amino ácido oxidasa hipotética
AF126447	<i>Agrobacterium vitis</i>	23	L-triptófano monooxigenasa
AB034801	<i>Mus musculus</i>	25	
P23623	<i>Neurospora crassa</i>	23	L-amino ácido oxidasa
O09046	<i>Mus musculus</i>	25	Fig-1, inducido por interleukina IL-4
O93364	<i>Crotalus adamanteus</i>	24	L-amino ácido oxidasa

El análisis mediante el algoritmo BLASTX de la secuencia de ADN y las seis traducciones posibles proteína hipotética deducida de la de ADN (6.3.2001), reveló altos porcentajes de similaridad con L-aminoácido oxidasas (LAAO) del pez *Scomber japonicus*, de la bacteria *Bacillus subtilis*, del hongo *Neurospora crassa* (Niederman & Lerch, 1990) y de la serpiente *Crotalus adamanteus* (Raibekas & Massey, 1998). También mostraba mucha similitud con un clon de ratón inducible por interleukina-IV (Chu & Paul, 1997), así como con una triptófano monooxigenasa –implicada en la producción de auxinas- de *Agrobacterium vitis* (Tabla 2.1). Igualmente aparecían homologías altas con otras muchas triptófano monooxigenasas de diversas especies del género *Agrobacterium*, así como con otras secuencias referidas siempre como hipotéticas LAAO.

La secuencia mostraba señales para glicosilación (10-NLTY, 243-NMSV, 261-NTTA y 293-NSTK), así como diversos sitios para fosforilación, de entre los que destacaba el situado en la posición 382, susceptible de una fosforilación dependiente de tirosina. No se observaba ningún indicio de péptido señal, ni utilizando el algoritmo SignalIP, ni por la hidrofobicidad de dicha secuencia,

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

<i>T.hazizianum</i>	1	HEKLSGSGPQGGQFLVMMHDLVDVDELSTLFLFTTLRQGITRKHITKACGQETGLACKGPNADPPES	0
<i>A. whitei</i>		-----	69
<i>N. crassa</i>	1	-----	32
<i>S. japonicus</i>	1	-----	0
<i>M. anisodactylus</i>	1	-----	0
<i>B. subtilis</i>	1	-----	0
<i>T.hazizianum</i>	1	SADQRAKIVTAVIYVMDATLQLIIDSGLAQATTASLVAVIVAPTRTVSISALLQSINLLESGRCLLD	138
<i>A. whitei</i>	70	-----	138
<i>N. crassa</i>	33	LNISRLSIRIVERSASVEGALSTTVGSCQAKREERANHSISQ---PTDADHDELVVUIPEWVQSGCGGISAW	99
<i>S. japonicus</i>	1	-----	0
<i>M. anisodactylus</i>	1	-----	0
<i>B. subtilis</i>	1	-----	0
<i>T.hazizianum</i>	2	DNVDFALSVVETMARLVRKVAKELNLTZELGVPGIPPPREGRFLGGYSDMLPDPFLYSSIKPA	70
<i>A. whitei</i>	139	DIISNTAIAISKMDATINTLTHAFTTEGLARISFVGFPTKGDAAETHWAYGMLLRFKACGSEFPYSDLL	207
<i>N. crassa</i>	100	YRANRHLVGRSHPQ-----YDFYKIRHRRDLKASATKPSDSIAIHWTTTUMGILRP---GCGPQVWLL	150
<i>S. japonicus</i>	1	-----	48
<i>M. anisodactylus</i>	1	-----	0
<i>B. subtilis</i>	1	-----	47
<i>T.hazizianum</i>	71	LLKEAPRAE-----ELFPRKVCIVGAGVSGLYSIAMILLDDLKIPHLTYDIFESISRTGCKLST	128
<i>A. whitei</i>	208	YDTKMTTESCRATREIGDTPVUSKPRVAVGAGLSELVVAJELLAGIDVDT---LYTASDREKGLKLS	274
<i>N. crassa</i>	161	EYKHSITVDV-----EKAKSKHIAIVGAGMSGLSTLCLTQAGTFFVSI---IIEGKMLGGRVST	217
<i>S. japonicus</i>	49	LDELPLNIE-----TSHNVVIVGAGHAGLTAANKLQDAGKTVT---ILEADNRGGRVST	100
<i>M. anisodactylus</i>	48	VTLGLMRTZ-----KPKQVVVVGAGVAGLVAANKLSDAGKTVT---ILEADNRGGRVST	90
<i>B. subtilis</i>	1	-----	32
<i>T.hazizianum</i>	129	HFTDAKHDYV---DIGAMEYDIPSHMR---TFMLPRTGPHLIXYFLDC---EMTPQLYVNHFFPA	185
<i>A. whitei</i>	275	YFIDMAPRVVA---ENGGMDFPPREIC---LFTFLKCYGLDSKCFPPFSGVDTTLYDGHQITGKA	336
<i>N. crassa</i>	218	YELSGPPTDYSYQEHREDFPPTITLGHETVYVSDQLVFLQAEHMSLNGESKMLSDVDFIPVQSMN	286
<i>S. japonicus</i>	101	YERE-KEGVA---EWGASHPISJHRI---VQGFVKKLVGHEHVFVTD---DMTFLYVGRVHTV	159
<i>M. anisodactylus</i>	100	FIDE-KTGGV---ELGASHPISJHRI---LHKLKRLGLMLQFTQTD---EMTUTEVHWKLRVTV	97
<i>B. subtilis</i>	33	LEISFIDDLTY---NAGPMSIPMSISL---TLEYIKKFLPITVFINET---PHDIYTAGKIKTRLV	151
<i>T.hazizianum</i>	187	-----	247
<i>A. whitei</i>	336	-----	404
<i>N. crassa</i>	287	GLTFFYDINKPPTGLPFLAELAAHSIALTRVYVNSKTKLSIKQVDAFLPDDKFLAEMAQMFYKAAHD	355
<i>S. japonicus</i>	159	UQEHDFVLE---YVVSSEKESISADDLDRALQVKEVTE---AGFKAALENYDYSVLEKYLKEG	219
<i>M. anisodactylus</i>	158	VEKHPKELC---YMLNHEBEGNSPEDIVQALHNAFKDLK---ALGFKAALENYDYSVLEKYLKEG	219
<i>B. subtilis</i>	92	FERAPVILB---YFQAPHEGKRTISELMLSLQLPILMTIQGPARHNSIVVEQKNSISLFLMTT	154
<i>T.hazizianum</i>	248	YLKRGVXGAPYVDTAIGQ---METQNTGTLFDQAFSEVIDSDYDF---DHPTEPQVYICGGTSLVD	313
<i>A. whitei</i>	405	KIFLGSNPPGGERMA-FPNDWDLFKLLGIGGCGFVTEGFLKILKLVVNGYDZMAQLIYESISELPR	472
<i>N. crassa</i>	356	WLSGGLALPLDQWSETGFWYVYLSGLMDDTAFLALITETGTRCTGCT---FPRRGAIDGKMLPL	422
<i>S. japonicus</i>	220	GLSPGAVVHISDLEKQSLQVYALSSHEIYDQADVDV---SDEWTFVGSDELLEPE	271
<i>M. anisodactylus</i>	220	MLSPGAVVHISDLEKQSLQVYALSSHEIYDQADVDV---SDEWTFVGSDELLEPE	271
<i>B. subtilis</i>	155	-FYGAVLHISGLVLDMAVHGHSILVEVRESIFYSIPA-----RFEYITGCGDMLLPR	205
<i>T.hazizianum</i>	314	ANKEETLVHVVQHEKRVDAISILDAPDQ---MHSURIGCKD-VSCESTVFTTALCLLDHDELREL	378
<i>A. whitei</i>	473	RISGQVQCVIIEBIRRVQVIA---IENKEMIKQVFNCGSLLDSDRDPVTSGLTSLQDELMLDADTL	540
<i>N. crassa</i>	423	SFPLVDNATLLEHLEKNSHATDQETKQVTLSEKSTYKDSITLSEHVAVIAAPTSYKMSRFSALDIT	491
<i>S. japonicus</i>	272	APLAVLDVLPVLSVNMHBIQS---DEGIVISYQVENSILMDJADIVDTTAKAAVLIPTDP---PLI	336
<i>M. anisodactylus</i>	271	ALLSLSIGALLSAPVUSITQI---ENDQVRIATISLNE-KTLADQVLLTASGPALOBITFSP---PLI	334
<i>B. subtilis</i>	206	APLQKLTMLIFQKNSHNSGQ---ENRVTINCGQQQTAETSIPTADLAIVTIPFSTLRFVVEVPSHFS	272
<i>T.hazizianum</i>	379	HPTQADARICLHSDSTVALEKFSYPMHIXDCGITGGAATLPLR---TVVPSYELDDT---GEAVLLA	604
<i>A. whitei</i>	541	QAEVNGAVENSMTGISELFLVTEGEPGLERQLP---PCVLTGVAR-AVYCF-DYEPDRGKGLVLI	644
<i>N. crassa</i>	492	APTLNAAIQLENTSACVVALEFETRFVWENLQPIYVSGSTTSDIPGIGSIITPSYRNGTQGPASILA	560
<i>S. japonicus</i>	337	ISKH-EALDSVYHDSSTKILLTPRDFWEDDGIH---GKKSITDGPGR---YIYVPSSEPTMETI	400
<i>M. anisodactylus</i>	335	RKQV-EALDSDVYHDSSTKILLTPRDFWEDDGIH---GKKSITDGPGR---YIYVPSSEPTMETI	393
<i>B. subtilis</i>	273	YVBE-SATRELSNIASTHIGIETFSRPEKAGQH---GKKSITDLPFR---LFTYPARCGI---LLLA	393
<i>T.hazizianum</i>	445	SVTVSQAATVIGSLVNDAPPQPKEDLVELLQMLARLAEHNTVY---EKINEAYTGGYVYCWARDP	512
<i>A. whitei</i>	605	STWEDDSKHLAV-----PKRRELALLSNDIKHTLFDFAKHLVPAQVFDGVDVVQDMLDTPRA	663
<i>N. crassa</i>	551	STISGADWGRVVS-----YPERENQVFLMAMALI---HGELVKEQ---TTEGPRRCKWALDPL	616
<i>S. japonicus</i>	401	STWEDSLLTICA-----SDRELKALADLAKIBEGQWDR---TTFY-IKMSRSDALDPL	453
<i>M. anisodactylus</i>	394	STWSDAAPTALG-----TVDQLKELQQAALHCGPQVRL---GDGKGVNKHADLDPH	447
<i>B. subtilis</i>	336	SYTVAEALIGDSL-----SEGERIQPTLKLSEIYGDIVGSE-----FVSI-STYPSGQSPPI	548
<i>T.hazizianum</i>	513	GGAFALGPGQFGLNLYPFLMR-PAAKGGKFRIVGCAF-----	397
<i>A. whitei</i>	666	GGAFELMRGQDVTIQLFTYQ-FPDVNS-----	662
<i>N. crassa</i>	517	SAINAFTVVGQHLVLEPTYQ-TRMRLVFGVETSYTHAGIARALESGIRGIVQLLELGLVD-DANCR	583
<i>S. japonicus</i>	454	LGAFALFTYVQLEVAQLFYSF-GRVFAGETAFPRAMISYKSKIAAATATIKKAVN-----EESTI	517
<i>M. anisodactylus</i>	448	QKGVVQPPYVQLEVAQDWSAPFCRIYFAGETALPQVQVETAVKSLGAAVLEHNTGQVGVQVQ	516
<i>B. subtilis</i>	390	AGCTTAFEPQLELYPTI-FVPEGVRFAGERASLTHAMQGAIESGIRGAVYVWMLP-----	446
<i>T.hazizianum</i>	0	-----	547
<i>A. whitei</i>	0	-----	602
<i>N. crassa</i>	604	PVDKNSHAGIDV-----	695
<i>S. japonicus</i>	518	EHTDEL-----	524
<i>M. anisodactylus</i>	517	ENATAGAWLQVPEVGRPEEQAREVUSPDEQEPISKMLLVETIPEEQQBAFVZAIYELGQVTVTV	585
<i>B. subtilis</i>	0	-----	446
<i>T.hazizianum</i>	0	-----	547
<i>A. whitei</i>	0	-----	602
<i>N. crassa</i>	0	-----	695
<i>S. japonicus</i>	0	-----	524
<i>M. anisodactylus</i>	585	PQEKCHARQNIYVSENVQVNGLVIPENHNGGSGTQVQNRVGDSE	630
<i>B. subtilis</i>	0	-----	446

Fig. 6: Alineamiento de la secuencia de la hipotética proteína producida por el clon#1 con L-amino ácido oxidasas.

analizada según el algoritmo de Kyte & Doolite. Mediante un experimento de

TABLA 2.2: Contenido en aminoácidos de la proteína hipotética producida por el clon #1 y de las L-lisina α -oxidasa purificadas de *T. viride* por Kusakabe *et al.* (1980) y Weber *et al.* (1994). Se presenta sombreada el área de los aminoácidos en los que el contenido es muy similar entre la clonada en este trabajo y alguna de las dos previamente purificadas. Para el cálculo se supuso que nuestra proteína formaba dímeros, como ocurre en las purificadas de *T. viride*.

Aminoácido	Kusakabe <i>et al</i> (1980)	Clon#2	Weber <i>et al.</i> (1994)
Lisina	54	62	44
Histidina	24	24	30
Arginina	32	50	34
Aspártico	120	90	98
Treonina	58	62	58
Serina	52	60	64
Glutámico	90	62	88
Prolina	48	66	46
Glicina	36	90	110
Alanina	76	80	64
Cisteína	14	16	ND
Valina	54	64	48
Metionina	22	26	0
Isoleucina	44	48	38
Leucina	92	100	74
Tirosina	56	60	22
Fenilalanina	42	48	42
Glutamina		24	
Aspargina		48	
Triptófano	32	14	ND

Southern se comprobó que el gen estaba presente en una sola copia en el genomio de *T. harzianum* (Fig. 5). El alineamiento de varias de estas secuencias se muestra en la figura 6. Se comprobó que las zonas de mayor similitud se distribuían por toda la proteína, y no sólo por el dominio de unión a FAD, descrito como un pliegue $\beta\alpha\beta$, y situado en el extremo amino con la secuencia VGAGX(S/A)G (Eggink *et al.*, 1990). Comparando el contenido en aminoácidos de la hipotética proteína producida por el clon #1 y de las L-lisina α -oxidasa purificadas de *T. viride* (Kusakabe *et al.*, 1980, y Weber *et al.*, 1994) se observó que, suponiendo que nuestra proteína fuera también homodimérica, dicho

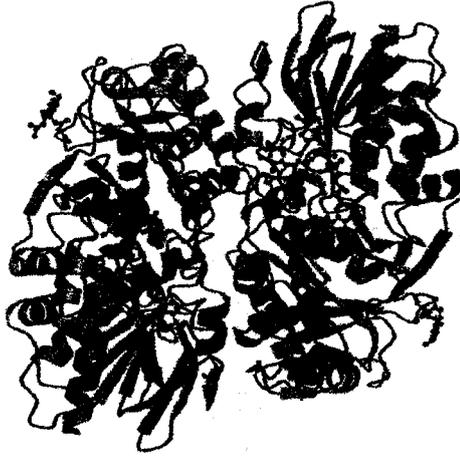


Fig. 7: Estructura tridimensional de la LAAO de *C. adamanteus* (Pawelek *et al.* 2000).

contenido era muy similar para muchos de los aminoácidos (Tabla 2.2). Por todos estos datos se podía suponer que la estructura tridimensional de la proteína producida por el clon #1 se podía parecer mucho a la que se conoce para la LAAO de *C. adamanteus* (Pawelek *et al.*, 2000) y que se muestra en la figura 7.

Las LAAO son flavoproteínas, generalmente homodiméricas, que catalizan la desaminación oxidativa de un L-aminoácido a su correspondiente α -cetoácido, liberando H_2O_2 y amoníaco. Esta reacción se lleva a cabo reduciendo FAD a $FADH_2$ según el esquema de la figura 8. Estos enzimas tienen una marcada preferencia por aminoácidos hidrofóbicos como la fenilalanina, el triptófano, la tirosina o la leucina (Curti *et al.*, 1992). Algunas de estas enzimas poseen una marcada toxicidad, como la perteneciente a *C. adamanteus*, presente en el veneno y que provoca apoptosis en células humanas (Suhr & Kim, 1996, Tori *et al.*, 1997, Souza *et al.*, 1999). En *N. crassa* se ha establecido que la actividad LAAO es inducible por la presencia de aminoácidos (L-aminoácidos e incluso D-metionina)

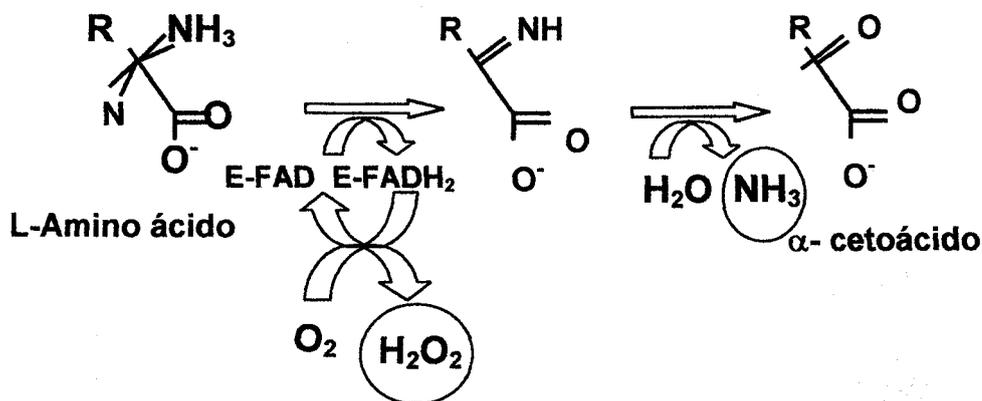


Fig. 8: Esquema de la reacción catalizada por la LAAO.

en ausencia de amonio, y reprimible por amonio (Sikora & Marzluf, 1982). Se realizó un experimento de northern-blot para comprobar si el clon #1 tenía el mismo patrón de regulación. Como se observa en la figura 9, el gen estaba regulado de manera opuesta a lo esperado. Se inducía fuertemente por la presencia de amonio o de glutamina, mientras que se reprimía cuando la única fuente de nitrógeno eran aminoácidos como D-metionina, L-leucina o L-triptófano. Además esta inhibición ocurre tanto a 30 mM como a 5 mM (Fig. 10).

Para comprobar cómo interactuaban entre sí el pH y la disponibilidad de la fuente de carbono y de nitrógeno, se realizó un experimento de Northern-blot con ARN extraído de micelio crecido en cultivos con todas las combinaciones de glucosa a alta o baja concentración, pH 3 o 6 y amonio o L-leucina como fuente de nitrógeno. En la figura 11 se muestra que cuando el gen estaba reprimido por la ausencia de amonio en el medio, cambios en el pH o en la disponibilidad de la fuente de carbono no provocaban ni mayor represión ni inducción. De manera análoga, cuando el gen estaba expresándose debido a la existencia de amonio en el cultivo, aunque a pH 6 la expresión es mayor que a pH 3, dicha expresión no

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

cambió cuando se alteraba la disponibilidad de carbono en el cultivo. Es decir el gen se induce fuertemente cuando hay amonio y se reprime por la ausencia de éste como única fuente de nitrógeno. En menor medida, también se induce cuando *T. harzianum* crece en un pH cercano a la neutralidad.

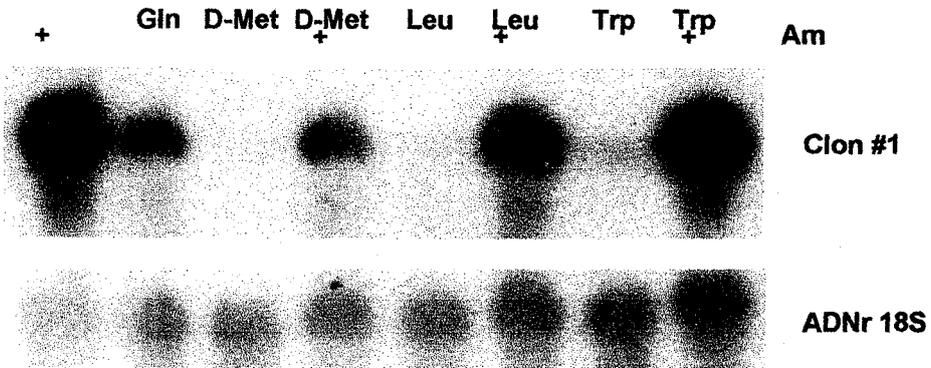


Fig. 9: Northern-blot realizado sobre ARN de *T. harzianum* crecido durante 8 horas en medios con la fuente de nitrógeno indicada: amonio 37 mM (Am, indicado con +), L-glutamina 30 mM (Gln), D-metionina 5 mM (D-Met), L-leucina 5 mM (Leu) y L-triptófano 5 mM (Trp). Previamente, el cultivo había crecido durante 40 horas en un medio con amonio 37 mM (0,5 %). Siempre se utilizó glucosa al 2 % como fuente de carbono. Como sonda se utilizó, en el panel superior, el fragmento del clon #1 obtenido del DDRT-PCR; y en el panel inferior, y como control de carga, se utilizó el ADNr 18S de rábano.

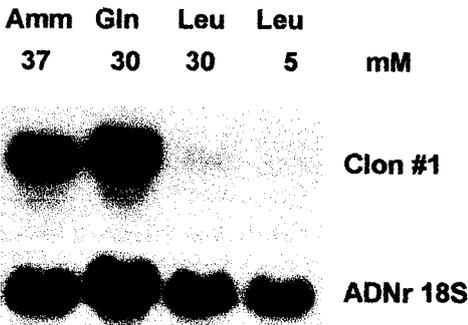


Fig. 10: Northern-blot realizado sobre ARN de *T. harzianum* crecido durante 8 horas en medios con la fuente de nitrógeno indicada: amonio (Am), glutamina (Gln) y leucina (Leu). Previamente, el cultivo había crecido durante 40 horas en un medio con amonio 37 mM (0,5 %). Siempre se utilizó glucosa al 2 % como fuente de carbono. Como sonda se utilizó, en el panel superior, el fragmento del clon #1 obtenido del DDRT-PCR; y en el panel inferior, y como control de carga, se utilizó el ADNr 18S de rábano.

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

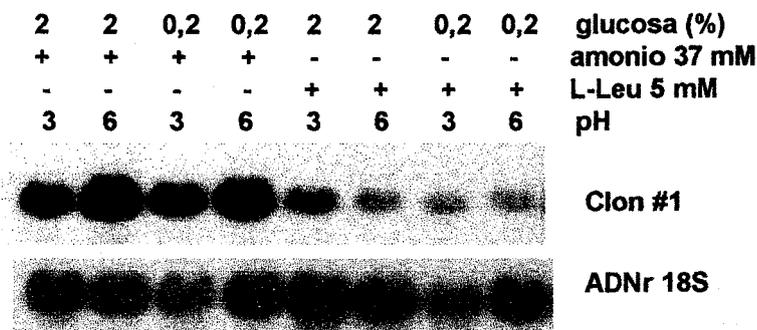


Fig. 11: Northern-blot realizado sobre ARN de *T. harzianum* crecido durante 8 horas en cultivos en las condiciones indicadas. Como sonda se utilizó, en el panel superior, el fragmento del clon #1 obtenido del DDRT-PCR; y en el panel inferior, y como control de carga, se utilizó el ADNr 18S de rábano.

TABLA 2.3. Similaridad (%) de la secuencia de la proteína producida por el clon#2 con otros transportadores

gen	Organismo	%	Nº acceso	Azúcar transportado. Afinidad
<i>hgt1</i>	<i>Kluiveromyces lactis</i>	43	P49374	Glucosa. Alta afinidad
<i>hgt1</i>	<i>Candida albicans</i>	41	O74713	Glucosa. Alta afinidad
<i>mst1</i>	<i>Amanita muscaria</i>	31	Z83828	Monosacáridos.
<i>rgt2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32	Q12300	Glucosa. Alta afinidad. Regulador
<i>hxt3</i>	<i>S. cerevisiae</i>	30	P32466	Glucosa. Baja afinidad
	<i>Neurospora crassa</i>	30	AL353820	
<i>snf3</i>	<i>S. cerevisiae</i>	30	P10870	Glucosa. Alta afinidad. Regulador
<i>galP</i>	<i>Escherichia coli</i>	32	P37021	Galactosa
<i>araE</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	28	Z99121	Arabinosa
<i>xylT</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	27	Z71474	Xilosa

3. Caracterización del clon #2

El segundo clon caracterizado en este trabajo, denominado como clon #2, se expresaba sólo en condiciones de desrepresión por baja concentración de glucosa, y dicha expresión era más alta a pH 3 que a pH 6 (Fig. 12). Con el fragmento obtenido se identificó un clon de ADNc a partir de una genoteca

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

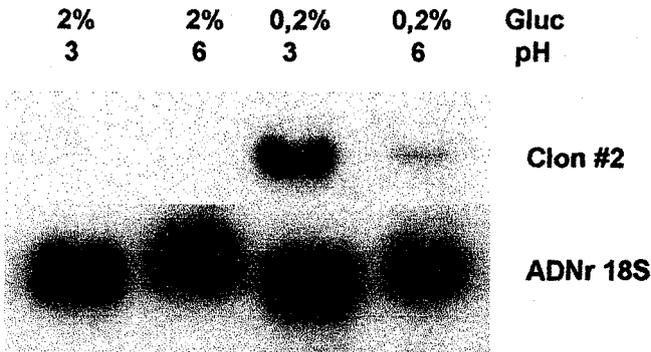


Fig. 12: Northern-blot realizado con ARN de *T. harzianum* extraído tras ser cultivado en las condiciones de glucosa y pH indicadas durante 8 horas. Previamente, el cultivo había crecido durante 40 horas en un medio sin tamponar y con glucosa al 2 %. Como sonda se utilizó, en el panel superior, el fragmento del clon #2 obtenido del DDRT-PCR; y en el panel inferior, y como control de carga, se utilizó el ADNr 18S de rábano.

realizada en λ ZAPII[®]. Este clon fue secuenciado y mostró una ORF de 544 aminoácidos en un fragmento de ADN de unas 1900 pb. Mediante PCR de una escisión en masa de la genoteca se obtuvo una banda perteneciente al extremo 5' que no añadía secuencia traducible alguna, por lo que se consideró completa la secuencia obtenida.

El análisis mediante el algoritmo BLASTX de la secuencia de ADN y las seis traducciones posibles, o mediante el algoritmo BLASTP de la secuencia de la proteína deducida de la de ADN (6.3.2001), reveló altos porcentajes de similitud con transportadores de glucosa (o de hexosas) de levaduras como *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, hongos filamentosos como *Amanita muscaria* o *Neurospora crassa*, así como con transportadores de pentosas de bacterias como *Bacillus* spp (Tabla 2.3). Esta similitud tan alta se encontraba, no sólo con transportadores funcionales, sino con aquellos que son reguladores de la respuesta a determinadas condiciones de disponibilidad de glucosa en el medio,

Thaenium olivae 1 0
R. laevis *FGT* 1 0
A. muscorum *MS71* 1 0
S. cerevisiae *FGT2* 1 MND5 QMCLRQRENSHLMPCGDFCHHQGAECTIHRHNSPHRNATTESTWDTAKSIVHCHDDPRAVQ 66
S. cerevisiae *SNF3* 1 0
S. cerevisiae *HK73* 1 HNSTPDLISPKLSEHSNAD---LPNHSQVM 29
A. crassa *FGT* 1 MIAVPTA3DR 13
B. subtilis *ARAE* 1 0
Bradyrhizobium *AY1* 1 0

Thaenium olivae 1 HAIGNIYUAGVUVG6ALFDFDINSVSAQLAEQSYLC 38
R. laevis *FGT* 1 ----HSLNKHLLLEDI QYE-GTFYKIPVYMI PVI GFIACISLMP6FDIAINWSSIGCTDVKD 60
A. muscorum *MS71* 1 ----MPPAATGNGGIDPKHMTGCI-ASTAFJAF6GILYFDTGIGIILANDHDPK 51
S. cerevisiae *FGT2* 67 I SYTHNEPA CDGAEITTS ILLS QPLPLRSNUSV-LUGIPVAGGCLF6YDTGLINSITDHPYK 131
S. cerevisiae *SNF3* 1 ----WTSYFDDISITIDDS ILFSEPPQKQSHMSI-CGUPVAGGCLF6YDTGLINSITDHPYK 63
S. cerevisiae *HK73* 30 HMPKCGQDDFQARADQULTHEHTKGAFTTUS-ICUNWAF6GTFYF6DTGCTIS6PVAQDFLR 94
A. crassa *FGT* 14 YVUTLTKSBNKT3ITTSI SVANKPFLCLGQQLML-AVAGAKEDTLLF6YDQVNGCILTLEPFL 78
B. subtilis *ARAE* 1 ----HKNPTTQLEPHVPTREHNSGCVLISICAAGLGCLL6YDQVNGCILTLEPFL 52
Bradyrhizobium *AY1* 1 ----MKQRRSLTIFSIITLVAALGCLL6YDQVNGCILTLEPFL 42

Thaenium olivae 39 YFNQDEMPPTADGKCGPRLVQCCITASMAAG3QLGALISGSLBRLKRYSIHVCCL-18WIF 103
R. laevis *FGT* 61 YFSB-----PDILTYYGICITASMAAG3QLGALISGSLBRLKRYSIHVCCL-18WIF 111
A. muscorum *MS71* 52 TFGQASDG-----TCSLPSSQLFVILSAGTFV6ALFGAPMEDI IERNHGIVIAAA-IP3IF 110
S. cerevisiae *FGT2* 132 YIAPNHSYF-----TTS-----QIALLW3FL3L6YDTPGALIAFPI3DYV6KMPITIMFTAVPIS 16
S. cerevisiae *SNF3* 64 BVAPNHSDF-----TAQ-----QMSILW3FL3L6YDTPGALIAFPI3DYV6KMPITIMFTAVPIS 187
S. cerevisiae *HK73* 95 RFGKHKKDC-----NYFLIKVETELIWEIFNIGCAIGIILAKL6EY6KRNGL6YDTPGALIAFPI3DYV6KMPITIMFTAVPIS 153
A. crassa *FGT* 79 YFQKIPDPAPGLTPRESBRSSTYQGISVASYELGCFI6AIIITFICN6P6RKKIILLGTS-18I9V 143
B. subtilis *ARAE* 53 -DLF-----SLSPHEELVSI3I6IG6YDTPGALIAFPI3DYV6KMPITIMFTAVPIS 103
Bradyrhizobium *AY1* 43 IDSL-----GCSLANHETV3SALIGCIIIG6YDTPGALIAFPI3DYV6KMPITIMFTAVPIS 94

Thaenium olivae 104 JTLSCA-----SQMI-GMLIVA-----BIINGISV6IESAQ--VPVIAEII3P6K6E6FIC6Q 155
R. laevis *FGT* 112 AILQCA-----AQDQ-AMLI6G-----BVIS6MIG6G6SIA--APVFCSEI3P6K6E6FIC6Q 163
A. muscorum *MS71* 111 IALQTA-----SVTA-APTUVG-----BVFAL6E6V6L6CL--V6P6G6S6I6A6V6V6Q 162
S. cerevisiae *FGT2* 188 HSLQVA-----3GCL-VLLI6G-----BVIS6G6I6G6I6SA--V6L6Q6A6A6K6L6G6AII6S 271
S. cerevisiae *SNF3* 120 MSLQV6-----A6GI-TLLI6G-----BVIS6G6I6G6I6SAV--V6L6Q6A6A6K6L6G6AII6S 239
S. cerevisiae *HK73* 154 IILQIA-----SINK6PQYF6G-----BII3GL6G6I6A6V6L--3P6L6I6V6A6N6E6T6L6S 206
A. crassa *FGT* 144 AILQ-A-----SATTL6E6F6I6G-----BII6G6S6G6T6T6I3Q6T6Q6T6I6K6E6K6H6W6E6 267
B. subtilis *ARAE* 104 AVUSAL-----3QVSTLIIA-----BII6G6I6G6S6I6A--SVT6I6A6P6A6I6E6L6S 155
Bradyrhizobium *AY1* 95 ALGASVPELFFPTRECEPTL3ILLAFVPTRI66G6G6L6A6I--CPYI6EIA6P6A6I6E6L6S 158

Thaenium olivae 156 WATW6GILINYYI3YGC3FICEDNPQVYTAAR6IP6GLQHPAFTLFT6HNP6L6P6S6P6L6AK6R 221
R. laevis *FGT* 164 F3YV6GINVLFYI6Y6CF6I6D-----GAAAFRTW6GL6H6V6L6H6V6V6F6I6E6P6L6A6N6R 222
A. muscorum *MS71* 163 WATIT6ILLAAVIN6AT6G6S-----HNSAYQIPI3IQ6V6AF6I6G6H6L6P6S6P6L6V6Q6R 221
S. cerevisiae *FGT2* 240 GAITI6LL6S6A6V6Q6T6H6K6-----CPSYTRIP6I6L6Q6V6S6I6A6V6L6P6S6P6L6V6Q6R 298
S. cerevisiae *SNF3* 172 GAITW6LL6S6A6V6Q6T6H6K6-----DASSTRIP6I6L6Q6V6S6I6A6V6L6P6S6P6L6V6Q6R 230
S. cerevisiae *HK73* 207 LMLTIGL6L6C6T6X6T6X6S-----N6V6Q6V6L6L6C6F6A6N6L6H6I6G6H6T6P6S6P6L6V6Q6R 265
A. crassa *FGT* 198 SLVTA6I6H6L6S6Y6I6L6L6STAP-----G6V6W6R6FL6A6Q6I6I6L6I6L6I6P6S6P6L6V6Q6R 256
B. subtilis *ARAE* 156 LFTIL6I6AT6Y6I6L6A6V6I6G6Y6W6--VHT6G6B6H6L6A6V6H6V6I6V6I6L6L6L6L6P6S6P6L6A6K6 219
Bradyrhizobium *AY1* 159 T6I6I6H6L6V6T6W6G6I6A6N6E6T6L6W6--NDV6G6R6T6A6S6A6I6P6L6L6A6L6L6V6E6T6P6S6L6A6I6Q6 222

Thaenium olivae 222 GEDRAVLT6H6K6G6D6P6H6P6G6A6V6L6Q6ID6N6C6E6P6R6Q6A6D6T6L6L6F6P6----RHINPTI6I6L6 282
R. laevis *FGT* 223 WETSILVANI6ANG6V6N6E6Q6R6F6Q6E6I6K6Q6I6D6S6A6N6F6Y6E6L6F6K6----NTL6K6T6V6S6 283
A. muscorum *MS71* 222 DEDAA6L6I6S6L6T6E6L6-3PDD6P6R6N6E6L6A6I6R6T6F6E6A6L6A6G6S6Y6L6C6P6R6N6--NILL6T6L6T6I6 284
S. cerevisiae *FGT2* 299 LMKAA6L6I6S6L6E6L6-PIED6R6L6L6Z6V6I6K6A6T6Y6E6A6F6G6P6S6L6D6C6T6S6E6R6P6Q6L6R6I6T6I6A 363
S. cerevisiae *SNF3* 231 IDEAA6L6I6S6L6E6L6-PPHD6I6L6L6Z6V6I6K6A6T6Y6E6A6F6G6S6I6D6C6I6S6I6K6P6Q6L6R6I6T6I6A 295
S. cerevisiae *HK73* 206 IDEBA6L6I6S6L6E6L6-APD6P6I6Q6E6L6V6I6A6V6E6L6A6A6I6A6S6G6L6T6K6--PAM6T6R6T6H6G6I6 327
A. crassa *FGT* 257 DAEAK6I6A6L6E6D6-ELDD6I6D6T6E6F6I6D6T6--V6H6K6G6I6K6L6T6W6K6--B6F6H6T6L6L6V6 316
B. subtilis *ARAE* 220 T6E6A6K6I6L6T6R6G6--E6V6A6K6E6L6N6I6E6S6L6K6E6Q6G6S6I6L6F6P6V6L6R6--KAL6I6G6L 272
Bradyrhizobium *AY1* 223 DQK6A6I6L6T6R6G6--S6E6A6K6I6E6D6I6T6T6V6--S6E6L6L6A6K6--LUV6V6G6L 272

Thaenium olivae 283 TQIGS6QLT6H6V6H6Y6I6A6I6T6M6A6G6S6G6A6R6L6A6S6I6Q6I6N6V6L6T6I6P6A6L6Q6V6K6G6R6P6T6L6I6G 348
R. laevis *FGT* 284 AQHQ6QL6C6H6N6H6Y6I6V6I6F6M6A6G6Y6C6T6R6L6V6A6S6I6Q6V6L6V6H6T6I6P6A6L6I6D6K6E6R6P6V6L6I6G 349
A. muscorum *MS71* 285 IQAG6QL6T6C6H6I6F6Y6T6Q6T6Q6A6G6I6Q6--APL6I6A6T6I6G6V6H6T6L6G6L6C6V6E6R6G6E6S6L6I6G 348
S. cerevisiae *FGT2* 364 IQAF6Q6A6S6E6M6I6F6Y6C6H6T6H6T6V6D6--S6L6S6P6I6S6A6V6W6A6F6I6P6C6H6L6D6R6I6C6E6P6V6L6A6G 427
S. cerevisiae *SNF3* 296 LQAF6Q6F6S6E6M6I6F6Y6C6H6T6H6T6V6D6--S6L6S6P6I6S6A6V6W6A6F6I6P6C6H6L6D6R6I6C6E6P6V6L6A6G 359
S. cerevisiae *HK73* 328 IQSL6QL6T6E6W6Y6F6T6Q6T6V6A6G6S6D6--S6T6S6I6V6G6V6H6T6S6T6C6L6S6T6D6R6P6C6R6N6L6Y6G 391
A. crassa *FGT* 317 NQV6Q6I6S6E6M6I6T6Y6A6V6I6S6L6E6S6D6L6A6L6A6L6G6T6E6T6I6A6N6A6V6L6E6R6G6E6K6L6I6G 382
B. subtilis *ARAE* 273 LAL6F6Q6I6G6M6A6I6T6T6E6P6I6R6H6G6F6Q6A6G6P6T6I6G6V6H6I6P6V6I6A6V6L6L6D6K6E6K6L6I6G 338
Bradyrhizobium *AY1* 274 L6V6T6Q6F6G6I6N6A6L6T6Y6A6P6I6E6S6G6A6G6S6L6Q6T6I6E6L6Q6V6H6I6P6V6I6A6V6L6L6D6K6E6K6L6I6G 338

Thaenium olivae 349 V6L6A6H6Y6A6G6I6L6T6E6V6P6-----GID6V6A6Q6S6H6V6T6A6P6A6K6L6I6A6L6T6R6V6A6S6A6P6T6E6P6V6 411
R. laevis *FGT* 350 I6F6H6T6L6F6V6A6G6I6L6T6E6V6P6G6V6D6D6T6U6I6Q6I6P6S6I6A6A6N6H6I6A6S6L6F6C6F6A6T6W6I6G 415
A. muscorum *MS71* 349 L6G6T6I6E6F6I6A6V6G6T6I6-----P6N6L6A6G6R6U6I6A6V6I6Y6I6A6T6A6P6W6E6L6 396
S. cerevisiae *FGT2* 428 V6I6T6A6N6L6I6A6V6G6S6E6-----C6T6V6A6S6I6N6I6A6I6L6I6A6A6I6A6T6G6V6 474
S. cerevisiae *SNF3* 360 V6I6T6A6N6L6I6A6V6G6S6I6-----N6V6A6A6K6V6M6I6A6I6L6I6A6A6I6A6T6G6V6 405
S. cerevisiae *HK73* 392 I6C6H6T6Y6V6A6S6G6V6T6L6D6-----N6E6L6N6S6S6K6A6C6M6I6N6F6A6T6Y6I6F6A6T6A6P6A6Y 446
A. crassa *FGT* 383 I6Q6A6T6H6A6L6A6V6N6E6P6-----D6D6P6Q6I6A6I6E6L6P6F6T6V6A6G6W6L6G6H6 428
B. subtilis *ARAE* 339 A6W6A6I6H6I6G6T6S6Y6-----E6L6T6S6I6H6I6W6L6I6G6V6A6F6U6S6V6D6I6W 382
Bradyrhizobium *AY1* 339 I6G6A6I6G6V6A6-6E6A6F6-----S6N6I6G6L6U6I6I6T6A6S6P6H6S6G6P6I6C 381

<i>Thiazium clon#2</i>	412	TYPPPELP-PLRLRGKGVAMATS	CGWAFTALGLTTPVA-----FANIKNKYLIFAUFTVAVFH	470			
<i>K.lactis FG77</i>	416	IYCSZIF-NRMRKANGIALSAAT	WNAFTALAMFPPSA-----FKNIJWNTYIIPGVFVVALTIQ	474			
<i>A.nusssaria ANST1</i>	397	VIWGEIF-PLQVRANGI	ILSVASBGLDMFGTAFATP	YLVMTQAGSAGLGSKVFPIGCTTACPLVF	461		
<i>S.cerevisiae FG72</i>	475	VUSAELY-PLQVRKCTAI	CAAAAGLVMFTCALITP	YVDVGSHTSISGPKIIFTIGGLRWVAVIV	539		
<i>S.cerevisiae SBF3</i>	406	VIJAELY-PLQVRKCTAI	CAAAAGLVMFTCALITP	YVDVGSHTSISGPKIIFTIGGLRWVAVIV	470		
<i>S.cerevisiae HAT3</i>	447	VVISZETP-PLRVRKAMSI	JATAAGLWGLIGFTTPI-----TGAINFYVGYVTHG	CVWFAYFY	505		
<i>N.crassa FG77</i>	429	LYPAEIV-PLRIRAPAKAL	STASNIIFRFVUVHITPVA-----FMKIKYQTYI	IFAVIMAFIVP	487		
<i>B.subtilis AR4E</i>	383	INISEIF-PKHLBARAA	CIATITLGGANGAIGQVPMHI-----DSTCLAYT	FGIYAVIHLPLF	442		
<i>Erngaplanin XLT</i>	382	VLISEIF-PKIRGSAVA	IAVAAGAAAYFISSTPVMH-----EYSG-CLTY	GYFGLMSVLSALF	440		
<i>Thiazium clon#2</i>	471	VTFPPETA	CKTLEETAMPED---PNCIPNCTPAWTKVATS	ILTVRAEQDLEANIANDTEHP	533		
<i>K.lactis FG77</i>	475	TFTFPETK	CKTLEEDQGVVD----NIPAGRTANYIPQLP	IVKDEEGMKLGLLGNPQRLEDVHS	535		
<i>A.nusssaria ANST1</i>	462	TYTCVPETK	GLSLEQIDENYQE----UMPLKSYQVRR-	LAIEGFPTEKADIHEETAEKESG-	520		
<i>S.cerevisiae FG72</i>	540	VYFAVYETK	GLTLEEIDELFRKAPNS	VISSEKMKKIKRCLAFFISQIENKTIK-	ACKLDMN	604	
<i>S.cerevisiae SBF3</i>	471	VELTVYETK	GLTLEEIDELVYKISTG	VVSPKFNKIDREBALKFYDPLQRLED	GKNTFFVAKRNF	536	
<i>S.cerevisiae HAT3</i>	506	VFTFVYETK	GLTLEEVDMYAEQVLP	PKSAISQVPTSQSGAMVDADALNDD	QPTFKMFKCK---	567	
<i>N.crassa FG77</i>	488	VYTFYPTA	CRILEEDHDIPIK-----VDGKKGFTT	QURQAKVPEKQDKDQRIIGADP	542		
<i>B.subtilis AR4E</i>	443	VDTI	CPETMKSLLEIKLGIK-----		464		
<i>Erngaplanin XLT</i>	441	VMKVPETK	CKTLEEQENRSGRKKQGAN	SKMAT-----	473		
<i>Thiazium clon#2</i>	534	INTHEEETTQ-----			543		
<i>K.lactis FG77</i>	536	NEKGLLDR	SDSASNSM-----		551		
<i>A.nusssaria ANST1</i>	0				520		
<i>S.cerevisiae FG72</i>	605	SPIVQDD	SMHIIDVD---GFLERQIQ	ENDMIADKSGGLVMIIDTAPL	STEFKPVHPFPV---	664	
<i>S.cerevisiae SBF3</i>	537	DETFRND	FRMTISGEIDNSP	MKQVHSIPERVDIPTSTEILE	SPKSSGNTVVPVPSLQDVP	PIQT	602
<i>S.cerevisiae HAT3</i>	0					567	
<i>N.crassa FG77</i>	543	EKTAGY	QSHSIPESSGFEKPT	MARVESPRADDITSSSDG	GNBS-----	588	
<i>B.subtilis AR4E</i>	0					464	
<i>Erngaplanin XLT</i>	0					473	
<i>Thiazium clon#2</i>	0					543	
<i>K.lactis FG77</i>	0					551	
<i>A.nusssaria ANST1</i>	0					520	
<i>S.cerevisiae FG72</i>	665					720	
<i>S.cerevisiae SBF3</i>	603	TEPAE	INTKTVDLGNLGLNTY	MRGPPSLSDSSEDYTEDEI	CGPSSQFDQSNRSTHND	INDYHAB	668
<i>S.cerevisiae HAT3</i>	0					567	
<i>N.crassa FG77</i>	0					588	
<i>B.subtilis AR4E</i>	0					464	
<i>Erngaplanin XLT</i>	0					473	
<i>Thiazium clon#2</i>	0					543	
<i>K.lactis FG77</i>	0					551	
<i>A.nusssaria ANST1</i>	0					520	
<i>S.cerevisiae FG72</i>	721	LIMS	ISITTEEDTS-FSPAHNS	MARTISNWTSDLASKHS	QYTSIQ---	763	
<i>S.cerevisiae SBF3</i>	669	LINT	STASATTDKFSGNQST	LYENTASSHSDTTEEDS	RLNDLGNGLALNAYMRG	PPSYLHNS	734
<i>S.cerevisiae HAT3</i>	0					567	
<i>N.crassa FG77</i>	0					588	
<i>B.subtilis AR4E</i>	0					464	
<i>Erngaplanin XLT</i>	0					473	
<i>Thiazium clon#2</i>	0					543	
<i>K.lactis FG77</i>	0					551	
<i>A.nusssaria ANST1</i>	0					520	
<i>S.cerevisiae FG72</i>	0					763	
<i>S.cerevisiae SBF3</i>	735	EANG	GETSDNLNTAQDLA	GNKERBAQFAQSYIDKRC	GLEPETQSMILSTSL	VMADTNEHMEILR	800
<i>S.cerevisiae HAT3</i>	0					567	
<i>N.crassa FG77</i>	0					588	
<i>B.subtilis AR4E</i>	0					464	
<i>Erngaplanin XLT</i>	0					473	
<i>Thiazium clon#2</i>	0					543	
<i>K.lactis FG77</i>	0					551	
<i>A.nusssaria ANST1</i>	0					520	
<i>S.cerevisiae FG72</i>	0					763	
<i>S.cerevisiae SBF3</i>	801	ISEEN	ATNQPVMENMDLK			818	
<i>S.cerevisiae HAT3</i>	0					567	
<i>N.crassa FG77</i>	0					588	
<i>B.subtilis AR4E</i>	0					464	
<i>Erngaplanin XLT</i>	0					473	

Fig. 14: Alineamiento de la secuencia de la proteína producida por el clon #2 con otros transportadores de azúcares

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

como *rgt1* y *snf3* en *S. cerevisiae* (Özcan *et al.*, 1996, 1998) o *rco-3* en *N. crassa* (Madi *et al.*, 1997). Sin embargo, en la secuencia de la proteína hipotética producida por el clon #2 no se encontró la cola hidrofílica en el extremo carboxilo característica de dichos reguladores y que parece ser la encargada de transmitir la señal (Özcan *et al.*, 1998, Madi *et al.*, 1997).

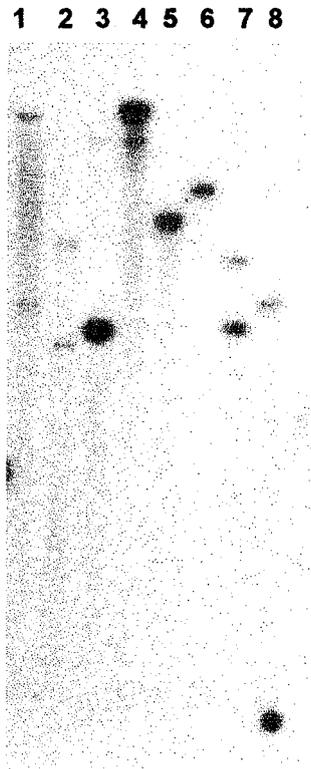


Fig. 14: Southern-blot realizado sobre ADN genómico de *T. harzianum* cortado con las siguientes enzimas: *EcoRI* (1), *SalI* (2), *XhoI* (3), *XbaI* (4), *ClaI* (5), *BamHI* (6), *HindIII* (7) y *SacI* (8). Se utilizó como sonda el ADNc del clon #2.

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

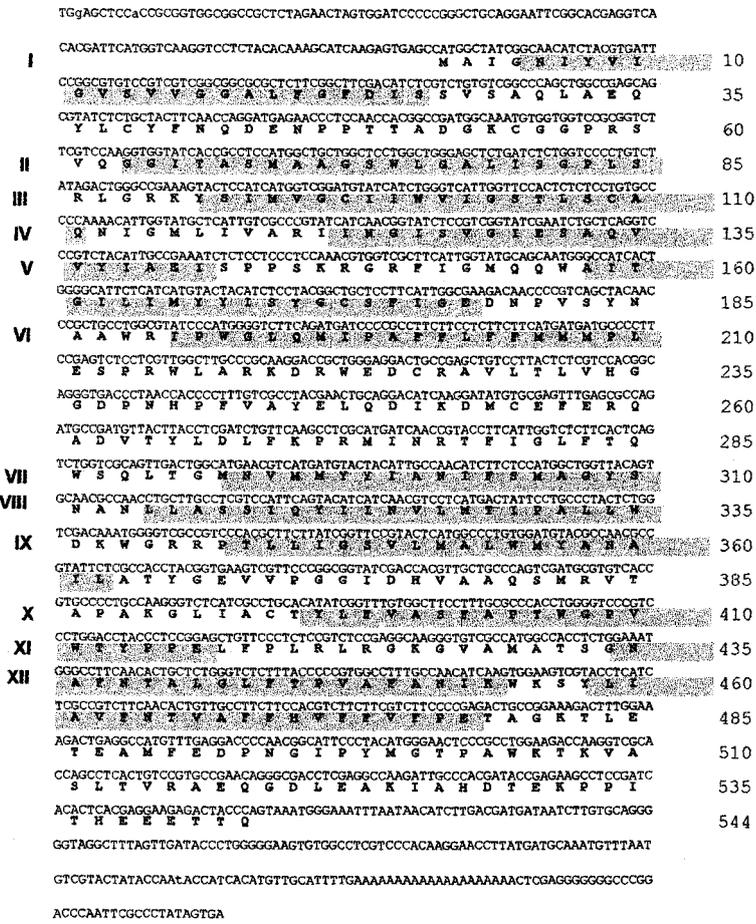


Fig. 15: Secuencia de ADNc del clon #2 y de la proteína hipotética producida. Los dominios transmembrana (I-XII) aparecen sombreados.

La secuencia muestra algunas señales para posibles modificaciones postraduccionales, como un sitio de glicosilación en 275-NRTE, así como diversos sitios de fosforilación, entre los que destaca uno para fosforilación dependiente de tirosina en la posición 265. El alineamiento de algunas de estas secuencias muestra, la presencia de ciertos residuos muy conservados entre transportadores eucarióticos y procarióticos (Fig. 13). Por otro lado, el análisis Southern del clon #2 reveló que el gen se encontraba en copia única en el genoma de *T. harzianum* (Fig. 14)

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

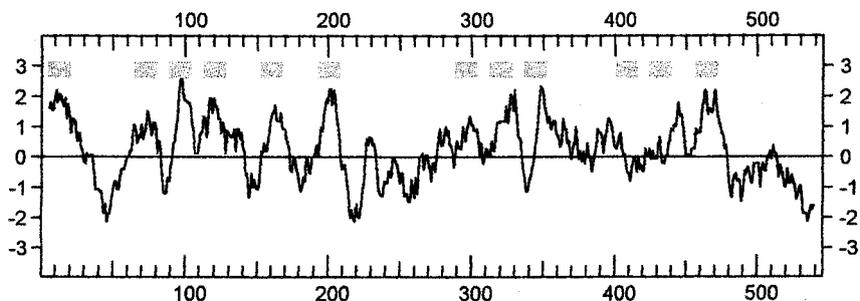


Fig. 16: Perfil hidropático según el algoritmo de Kyte & Doolite del clon #2. Están señalados los dominios transmembrana.

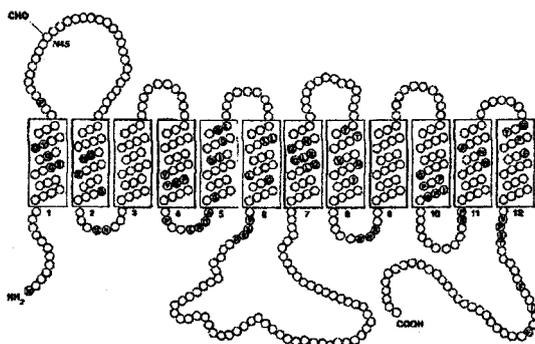


Fig. 17: Esquema de la estructura del transportador GLUT1 de humano (tomado de Gould & Seater, 1997).

El uso del algoritmo TopPred 2 (www.biokemi.su.se/~server/toppred2/toppredServer.cgi) reveló la existencia de doce dominios transmembrana (Fig. 15). Estos dominios estaban agrupados de manera que entre el VI y el VII existía un gran lazo hidrofílico intracelular. Se observó también una cola hidrofílica en el extremo carboxilo, aunque de un tamaño insuficiente para cumplir un papel regulador. También poseía un gran lazo extracelular entre los dominios I y II. Este tipo de estructura se corroboró con el perfil de hidrofobicidad obtenido para la

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

proteína (Fig. 16) y es muy similar a la que se conoce para los transportadores GLUTs de humanos (Fig. 17, Gould & Seater, 1997).

La estructura de la proteína hipotética producida por el clon #2 indicaba claramente que el gen codificaba un transportador de azúcares. Se realizó un experimento de Northern-blot para comprobar su expresión en medios con distintas fuentes de carbono y pH (Fig. 18). El gen se desreprime en ausencia de glucosa, siendo su expresión mayor a pH ácido que a pH neutro. La represión por glucosa prima sobre el pH, ya que no hay expresión en un medio a pH ácido con 2 % de glucosa, lo que sí ocurre cuando se usa galactosa (Fig. 18). Con el fin de buscar qué azúcares inducían la expresión del clon #2, se realizó un experimento de Northern-blot ampliando el número de azúcares utilizados y combinándolos a distintas concentraciones con glicerol (Fig. 19). Se observó en primer lugar que el gen se reprimía por glucosa pero que no por glicerol. La adición de galactosa, glucosa o fructosa a un cultivo con glicerol no provocó un aumento de la expresión más allá

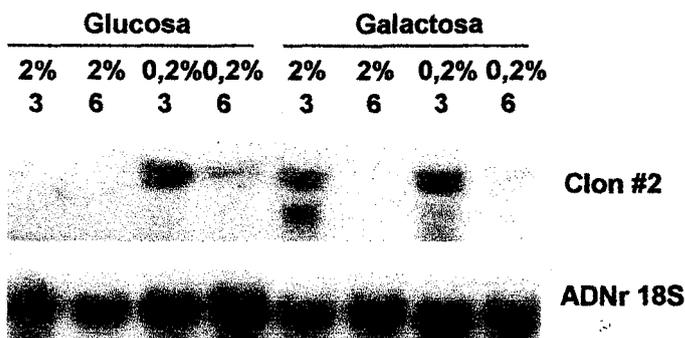


Fig. 18: Northern-blot realizado con ARN de *T. harzianum* extraído tras ser cultivado en glucosa y galactosa (2 %,o 0,2 %) y pH 3 ó 6 durante 8 horas. Previamente, el cultivo había crecido durante 40 horas en un medio sin tamponar y con glucosa al 2 %. Como sonda se utilizó, en el panel superior, el fragmento del clon #2 obtenido del DDRT-PCR; y en el panel inferior, y como control de carga, se utilizó el ADNr 18S de rábano.

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

de la desrepresión parcial causada por el glicerol. Sin embargo, la combinación de arabinosa o xilosa al 0,2 % con glicerol sí indujo un aumento de tres a cuatro veces en la expresión del clon #2. Es decir, el gen era reprimible por glucosa, se desreprimía fuertemente en ausencia de ésta, se expresaba débilmente si el cultivo tenía glicerol, y era inducible por la presencia de pentosas como fuente de carbono.

La inducción se produce, sin embargo, sólo a bajas concentraciones de las pentosas, ya que a altas concentraciones en combinación con glicerol el gen no aumentó su expresión con respecto a la que se observó en glicerol. Es decir, el clon #2 era inducible a bajas concentraciones de xilosa, pero no a altas. Los datos obtenidos con arabinosa eran, sin embargo, menos claros en cuanto a su inducibilidad.

Se intentó comprobar si el clon #2 era capaz de complementar, aunque fuera parcialmente, las mutaciones en el transporte de hexosas de *S. cerevisiae*. Para ello se utilizaron las cepas RE700A, que es incapaz de crecer con glucosa

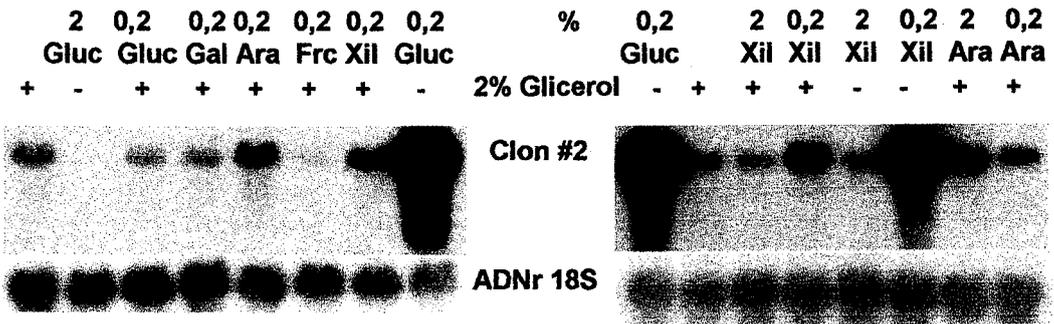


Fig. 19: Northern-blot realizado con ARN de *T. harzianum* extraído tras ser cultivado con las fuentes de carbono indicadas: glicerol (+/-), glucosa (Gluc), fructosa (Frc), arabinosa (Ara), xilosa (Xil) al 2 % o 0,2 % durante 8 horas. Previamente, el cultivo había crecido durante 40 horas en un medio sin tamponar y con glucosa al 2 %. Como sonda se utilizó, en el panel superior, el fragmento del clon #2 obtenido del DDRT-PCR; y en el panel inferior, y como control de carga, se utilizó el ADNr 18S de rábano.

Resultados: Aislamiento de genes regulados por pH

como única fuente de carbono, y EBY.VW4000, que es incapaz de transportar hexosas. El clon #2 se situó bajo el control del promotor de la fosfoglicerato kinasa de levadura en el vector pAJ401, y se transformaron dichas cepas. Se analizó si las levaduras parentales y las transformadas con el vector vacío o con nuestro inserto eran capaces de crecer en medios con distintas fuentes de carbono. Sin embargo, no se obtuvo ningún resultado positivo. La expresión del clon #2 no revertía la falta de crecimiento de la levadura en medios con glucosa, galactosa, manosa, fructosa, rafinosa, arabinosa ni xilosa.

DISCUSIÓN

1. Aislamiento de un clon de *T. harzianum* con un alto grado de similitud con L-aminoácido oxidasas

Mediante la técnica conocida como "Differential Display" se ha aislado un fragmento de ADNc que potencialmente codifica una proteína con un alto grado de similitud con L-aminoácido oxidasas (LAAO) de *N. crassa* (Niederman & Lerch, 1990), *C. adamanteus* (Raibekas & Massey, 1998) y *S. japonicus*. En estos dos últimos organismos, un reptil y un pez, estas enzimas parecen estar implicadas en procesos apoptóticos, ya que, por sí solas, las LAAOs provocan el desarrollo de los síntomas del suicidio celular (Suhr & Kim, 1996, Tori *et al.*, 1997, Souza *et al.*, 1999). La LAAO de *C. adamanteus* constituye el 30 % del veneno que produce este reptil, mientras que la del pez *S. japonicus* se induce ante la presencia de un nemátodo que lo parasita. En ambos casos, por tanto, la enzima juega un papel importante en la virulencia o en la defensa. En la reacción que cataliza una LAAO se produce amoníaco y H₂O₂. Se ha probado que los efectos tóxicos de la actividad de esta enzima pueden inhibirse con antioxidantes de membrana o con catalasa (Tori *et al.*, 1997), lo que lleva a pensar que la acción se dirige, mediante el H₂O₂ producido, a las membranas celulares. Aunque no se conoce la secuencia, se ha descrito una L-lisina α -oxidasa de *T. viride* que, debido probablemente a esa capacidad para producir apoptosis, actuaba como agente antitumoral (Kusakabe *et al.*, 1980).

Se ha aislado un clon de ratón (*Fig1*) que posee un alto grado de similitud con los clones anteriores. Este gen se induce fuertemente en respuesta a interlequina-4 (Chu & Paul, 1997). Los autores postulan que, dada su implicación en procesos inflamatorios y su similitud con monoamino oxidasas, la proteína FIG1 podría encargarse de inactivar transmisores monoaminados del tipo de la serotonina, aunque no se puede descartar que los productos de reacción sean los encargados de desencadenar la acción requerida.

Discusión: Aislamiento de genes regulados por pH

El tercer grupo de proteínas con las que el clon #1 comparte una similitud superior al 20 % son las oxigenasas del triptófano del género *Agrobacterium*. Estas enzimas, mediante la oxidación del triptófano, producen indolpiruvato, que se descarboxila para dar indolacetamida, que puede, a su vez, ser sustrato de una aldehído deshidrogenasa para dar lugar a hormonas vegetales como las auxinas. *Agrobacterium* sintetiza grandes cantidades de dichas hormonas, que provocan el desarrollo de tumores en las plantas. Se ha descrito que *Trichoderma* también produce auxinas y que promueve el crecimiento de las plantas (Harman, 2000), aunque no se conoce ningún gen ni enzima implicado en la síntesis de dichas hormonas.

En nuestro grupo hemos intentado, aunque sin éxito, producir la proteína en bacterias y en levaduras fusionada a GST. Por tanto, no tenemos datos bioquímicos que nos ayuden a conocer la reacción catalizada por la proteína producida por el clon #1 ni su función biológica. Sólo disponemos en la actualidad de los datos relativos a su secuencia y a la regulación génica.

Se han purificado dos L-lisina α -oxidasas de *T. viride* (Kusakabe *et al.*, 1980 y Weber *et al.*, 1994). Estas proteínas no sólo poseen capacidad antitumoral sino también pueden ser utilizadas como biosensores (Albery *et al.*, 1996). Para las dos terceras partes de los aminoácidos el contenido en estas proteínas es idéntico a la de la proteína del clon #1, suponiendo que esta proteína, como las otras, fuera dimérica. Esto, unido a los datos de similitud, nos indujo a pensar que estábamos ante una L-aminoácido oxidasa de *T. harzianum*.

Aunque se conocen varios genes que codifican LAAO, sólo se ha caracterizado el patrón de regulación del gen correspondiente a *N. crassa*, en el que la expresión está regulada de manera que es inducible en ausencia de amonio y presencia de L-aminoácidos como la leucina o, incluso, por D-aminoácidos como la D-metionina (Niederman & Lerch, 1991). Lo mismo se ha constatado para la actividad enzimática (Sikora & Marzluf, 1982). Este patrón de regulación que

Discusión: Aislamiento de genes regulados por pH

implica la represión por amonio y glutamina, viene determinado en *N. crassa* por la acción coordinada de los genes *nit-2* y *nmr* (Marzluf, 1997). De hecho, se requiere del gen *nit-2* funcional para la expresión de LAAO (Calderón *et al.*, 1997). Sin embargo, el patrón de expresión que exhibe el clon #1 es completamente opuesto: inducción en presencia de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables como el amonio y la glutamina y represión por L-aminoácidos. Ni el pH ni la glucosa son capaces de reprimir en condiciones de inducción ni de inducir en condiciones de represión. Sólo se observa un leve efecto en medios con glucosa y amonio, donde el gen se expresaba más a pH 6 que a 3.

Tenemos entonces un gen que está regulado de manera inversa a aquéllos a los que se parece. Podíamos suponer que se trata de una enzima encargada de catalizar la reacción contraria, es decir, de consumir amonio y H_2O_2 (o cualquier otro donador de poder reductor) para reducir y aminorar un α -cetoácido a su correspondiente L-aminoácido en condiciones de crecimiento rápido en que haya una gran demanda de aminoácidos (Fig. 20). El gen que codifique esta enzima podríamos sospechar que, teóricamente, sería inducible por amonio y, quizás, un pH alto y reprimible por aminoácidos, como resulta ser el clon #1.

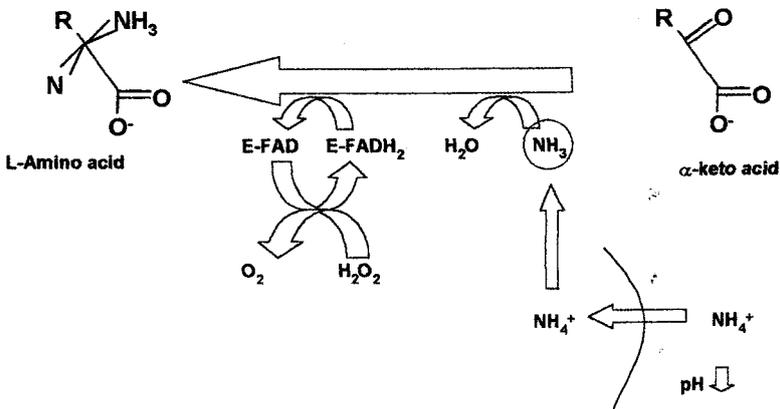


Fig. 20: Esquema de una hipotética reacción que consumiendo H_2O_2 y amoniaco del medio, provocando un descenso del pH.

Discusión: Aislamiento de genes regulados por pH

Así, en un medio con amonio, éste sería tomado para construir aminoácidos a partir de los correspondientes α -cetoácidos que hay en la célula. El consumo de amonio del medio provocaría una caída del pH. La reacción catalizada por una verdadera LAAO daría lugar al efecto contrario: si el hongo crece en un medio con L-aminoácidos como fuente de nitrógeno, la oxidación de éstos daría lugar a la producción de amonio y, de igual manera, a la elevación del pH. De hecho, esto es lo que ocurre en *T. harzianum*. Cuando *T. harzianum* crece en un medio con amonio, el medio se acidifica bruscamente. Sin embargo, creciendo con L-leucina como fuente de nitrógeno, el pH del cultivo se mantiene alrededor de 4-5, muy lejos del 2,5 que se alcanza utilizando amonio. El pH sería incluso más alto si no se utilizara glucosa como fuente de carbono, cuyo consumo produce gran cantidad de ácido débiles, responsables también de la acidificación del cultivo.

Esta relación entre el metabolismo del nitrógeno y el pH del cultivo podría ser utilizada por el hongo para adecuar su respuesta al medio. Así, al oxidar los aminoácidos por una LAAO y elevar el pH del medio, se mantendría el pH a unos valores que permitirían la acción de las proteasas, generalmente alcalinas, que son las principales proveedoras de los aminoácidos. Un medio de cultivo con una fuente de nitrógeno peptídica, daría lugar a un nivel de aminoácidos interno alto, permitiendo la acción de una LAAO, cuya actividad provocará por una parte, la liberación de esqueletos carbonados que sería sustrato de otras rutas metabólicas y, por otra, una elevación del pH, que permitiría la acción de las proteasas, encargadas de seguir produciendo aminoácidos. De esta manera los organismos pueden alterar el pH de forma que se favorezca la acción de unas u otras enzimas. Esto se ha propuesto para *M. anisopliae* (St. Leger *et al.*, 1999), un hongo parásito de insectos. Cuando *M. anisopliae* infecta una cutícula, el pH de ésta aumenta. Además, los enzimas implicados en la degradación de la cutícula tiene un pH óptimo para su actividad relativamente neutro o alcalino (St. Leger *et al.*, 1998). En

Discusión: Aislamiento de genes regulados por pH

A. nidulans también se ha sugerido que el uso de fuentes de carbono no favorables puede elevar el pH intracelular por catabolismo de aminoácidos (Espeso *et al.*, 1993) favoreciéndose, a ese pH, la síntesis de antibióticos. De un modo similar, cuando *T. harzianum* utilizaba quitina como fuente de carbono, no acidificaba el medio, facilitando así la acción de las enzimas encargadas de la degradación de la quitina, y de otros enzimas degradadores de paredes celulares, cuyo pH óptimo (5-6) está próximo al valor del pH al que se mantenía el medio de cultivo. Igualmente ocurría con las proteasas si se utilizaba caseína como fuente de nitrógeno (ver capítulo 1 de esta tesis).

Evidentemente, no debe ser éste el único gen responsable de la alteración del pH externo, pero sí parece ser una actividad importante. El gen se expresa abundantemente y sus sustratos son fáciles de encontrar en el medio. No se nos escapa tampoco que la liberación de amoníaco al medio puede llegar a ser un mecanismo de ataque-defensa. Sin embargo, parece más sencillo que el amoníaco en solución se convierta en amonio rápidamente. La posibilidad de lograr cepas que alteren el pH del medio en mayor o menor grado mediante la manipulación de este gen puede conducir a una mejor comprensión de cómo alteran los organismos el pH del medio para adecuarlo a sus necesidades metabólicas.

2. Aislamiento y caracterización de un gen de *T. harzianum* con un alto grado de similitud con transportadores de azúcares

El segundo gen aislado mediante "Differential Display" mostraba una expresión mayor a pH ácido que a neutro, siendo además fuertemente reprimible por glucosa. La secuencia de este gen reveló un alto grado de similitud con transportadores de azúcares de levaduras, *N. crassa* y *A. muscaria*, los únicos hongos en los que, hasta el momento, se han caracterizado genes que codifican transportadores. La proteína traducible por este gen presentaba 12 dominios transmembrana con la estructura típica de un transportador de azúcares: lazo

Discusión: Aislamiento de genes regulados por pH

extracelular entre dominio I y II, gran lazo intracelular entre dominios VI y VII, y pequeña cola hidrofílica (Gould & Seater, 1997, Mueckler, 1994). así como una cremallera de leucina entre el dominio I y el II, posiblemente implicada en la oligomerización de la proteína con otras moléculas similares (Özcan & Johnston, 1999). Los datos de secuencia no arrojan ninguna duda acerca de que se trata de un transportador de azúcares. También muestra similitud con transportadores de quinato de *Aspergillus*, sin embargo, éstos sólo poseen ocho dominios transmembrana (Hawkins *et al.*, 1988).

Como se ha indicado, el clon #2 mostró un alto grado de similitud con transportadores de glucosa de levaduras, tanto de alta como de baja afinidad. Ambos tipos de transportadores son muy similares y esta diferencia de afinidad no viene dada por secuencias distintas, sino probablemente por aminoácidos concretos que definen su actividad y también por su patrón de regulación. Así, los transportadores de alta afinidad se expresarán en condiciones de carencia de azúcares (principalmente hexosas y, sobre todo, glucosa), mientras que los de baja afinidad se expresarán en condiciones de abundancia de glucosa (Özcan & Johnston, 1999).

La proteína codificable por el clon #2 muestra mucha similitud también con los transportadores que funcionan como sensores de la concentración de glucosa en el medio: *snf3* y *rgt2* en *S. cerevisiae* (Özcan *et al.*, 1996, 1998) y *rco-3* en *N. crassa* (Madi *et al.*, 1997). Estas permeasas no son especialmente eficientes transportando glucosa, y los genes se expresan a un nivel muy bajo, por lo que su colaboración en la introducción de glucosa en la célula es escasa. El aspecto más importante de su función se halla en una cola hidrofílica que queda dispuesta hacia el citoplasma y que es la responsable de su acción reguladora. La cola de *Snf3* es necesaria para la inducción de la expresión *HXT2* y *HXT4* cuando la glucosa está presente a una concentración baja; de manera análoga, la cola de *Rgt2* se requiere para que la inducción de *HXT1* cuando hay mucha glucosa en el medio (Özcan *et*

al., 1998). Tanto es así que, si a Hxt1 o a Hxt2 se les fusiona la cola del extremo carboxilo son capaces de complementar mutaciones *snf3* y *rgt2* (Özcan *et al.*, 1998), e incluso la expresión de la cola por separado provoca la supresión del efecto de estas mutaciones (Coons *et al.*, 1997).

La proteína hipotética producida por el clon #2 era muy similar a éstas pero no poseía dicha cola reguladora. Sin embargo, los resultados anteriores abren la posibilidad de construir un gen quimérico con el clon #2 y una cola hidrofílica en el extremo carboxilo. Si esta proteína fuera capaz de desencadenar la inducción de genes que se expresan normalmente en condiciones de escasez de glucosa, cabe la posibilidad de conseguir cepas que expresen estos genes –muchos de ellos pertenecientes a hidrolasas- en las condiciones que regularan el promotor desde el que se controlara la expresión del gen quimérico.

Esta proteína mostró también mucha similitud con transportadores de pentosas de bacterias como *Bacillus*. La ausencia de secuencias de otras permeasas de pentosas en eucariotas impide establecer una relación más amplia entre similitud de secuencia y molécula transportada, si bien, los trabajos realizados con hexosas refieren esta especificidad a aminoácidos concretos más que a secuencias más o menos largas.

Sin embargo, por el patrón de regulación del clon #2 sí se puede deducir que es un transportador de pentosas. El gen está sujeto a una fuerte desrepresión por ausencia de glucosa en el medio, así como a una fuerte represión por glucosa. De estos datos se puede descartar que se trate de un transportador de glucosa de baja afinidad, ya, en este caso, el gen se expresaría cuando hubiera abundante glucosa en el cultivo. Por otro lado, el clon #2 se desreprime parcialmente en presencia de glicerol, lo que representa un patrón típico de gen reprimido por glucosa por medio de los factores de transcripción Mig1 o CreA (Ronne, 1995, Gancedo, 1998). En estas condiciones, sólo se logra inducir la expresión del clon #2 al añadir pentosas al medio a una concentración de 0,2 %. Es decir, su patrón de

Discusión: Aislamiento de genes regulados por pH

expresión sería el esperable para un transportador de pentosas de alta afinidad, encargado de introducir moléculas de xilosa y, quizás, arabinosa, en la célula cuando dichos azúcares sean escasos en el medio.

La expresión del transportador en dos cepas de levaduras que no permean hexosas o glucosa no ha logrado complementar dicho fenotipo. En el caso de la xilosa era un resultado esperado, ya que *S. cerevisiae*, aunque sí transporta xilosa a través de las permeasas de glucosa, no la metaboliza, por lo que necesita de un sustrato adicional del que obtener energía (Meinander & Hahn-Hägerdal, 1997). Por otro lado, no deja de ser un experimento de expresión en un sistema heterólogo, con todas las limitaciones que ello conlleva. Es posible que la inserción del transportador en la membrana, o su interacción con algunos componentes de la bicapa no sea idónea para llevar a cabo su función. Finalmente, aunque el gen es inducible por pentosas, los experimentos con levaduras no permiten descartar que, aunque con mucha menor afinidad, este gen pudiera estar implicado en el transporte de glucosa.

Los experimentos de Southern tanto en condiciones restrictivas como no restrictivas revelan la existencia de una sola copia del gen. Esto no debe considerarse como indicio de que el transportador lo sea de un azúcar distinto de la glucosa, ya que, aunque *S. cerevisiae* tiene hasta 17 genes *HXT* (Özcan & Jonhston, 1999), otras especies como *K. lactis* poseen sólo dos transportadores de glucosa: uno de alta y otro de baja afinidad (Billard *et al.*, 1996, Wésolowski-Louvel *et al.*, 1992).

Finalmente, un aspecto muy interesante y no estudiado es la regulación por pH: el gen parece reprimible a pH neutro, no sólo en condiciones de desrepresión cuando la concentración de glucosa es baja, sino cuando la fuente utilizada es galactosa, sea a niveles altos o bajos. En primer lugar, es evidente el hecho de que el pH ácido no evita la represión debida a la glucosa, lo que también ocurre con el clon #1 presentado previamente en esta tesis. Esto no es extraño, ya que cuando

Discusión: Aislamiento de genes regulados por pH

crece con glucosa y amonio, *T. harzianum* acidifica el medio, por lo que es lógico que dos elementos que, generalmente se encuentran asociados, no se contrapongan al desencadenar procesos reguladores. La acidificación es algo extendido en hongos, y, generalmente, se asocia con la producción de ácidos débiles a causa del metabolismo de la glucosa, aunque no hay muchas pruebas experimentales de ello. Se ha descrito en *Penicillium cyclopium* que la glucosa estimula fuertemente la transferencia de electrones, siendo ese flujo independiente de si la glucosa es metabolizada o no (Pönitz & Roos, 1994). Se produce una acidificación interna y externa, mediada por una ATPasa de protones que, inducida por el descenso del pH citoplásmico, extruye protones. Esto puede representar una vía de acidificación desconocida hasta ahora, relacionada con componentes de membrana encargados de sensar la glucosa externa y, sin transportarla ni metabolizarla, desencadenar el flujo electrónico (Pönitz & Roos, 1994).

Sin embargo, el uso de la galactosa sí permite observar que el gen es inducible a pH ácido o reprimible a pH neutro. Se sabe que, en levaduras, los transportadores funcionan por difusión facilitada, aunque en otros organismos introducen la glucosa mediante un simporte de protones (Lagunas, 1995). De esta manera, la disponibilidad de protones podría estimular el transporte de azúcares, de manera que, en un cultivo a pH ácido, se inducirían los genes de aquellos sistemas de transporte que pudiera utilizar esos protones para realizar su función. Éste podría ser el caso en *T. harzianum* con el transportador de xilosa. Esos protones, podrían ser lanzados fuera de la célula con la bomba ATPasa descrita en *P. cyclopium* para mantener la homeostasis del pH intracelular, bien contribuyendo a la acidificación del cultivo junto con la excreción de ácidos débiles, o bien para servir de nuevo como “compañía” del azúcar en su viaje al interior de la célula.

Todo esto inevitablemente nos lleva a recordar lo que se comentó en la introducción de este capítulo de la regulación por estrés y que une la disponibilidad de fuentes fácilmente asimilables de carbono y nitrógeno, el pH y la respuesta a

Discusión: Aislamiento de genes regulados por pH

estrés. Probablemente todas estas respuestas están interconectadas a través de cascadas de señales comunes y, probablemente también, todas o casi todas, colaboran en un fenómeno tan complejo como el micoparasitismo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las cepas de *T. harzianum* que sobreexpresan la β -1,6-glucanasa II son mejores antagonistas del hongo fitopatógeno *R. solani*.
2. Se ha conseguido producir la proteína BGN16.2 prácticamente pura aumentando el número de copias del gen, controlado por un promotor de expresión fuerte. La estabilidad de la proteína está regulada por el pH y por aspartil-proteasas.
3. *T. harzianum* posee una batería de proteasas cuya actividad está regulada por el pH y por, al menos, las fuentes de nitrógeno y carbono.
4. Se ha clonado un gen, *papA*, que codifica una aspartil-proteasa extracelular cuya expresión están controlada por la disponibilidad de nitrógeno orgánico en el medio. La sobreexpresión de esta proteasa no afecta negativamente a la producción de proteína BGN16.2
5. Mediante "Differential Display" se han aislado varios genes regulados por pH. Uno de ellos parece codificar una L-amino ácido oxidasa inducible por amonio. Hasta el momento desconocemos su función.
6. El segundo gen caracterizado codifica un transportador de azúcares, probablemente de pentosas. El gen está reprimido fuertemente por glucosa y es por inducible xilosa y arabinosa.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Ahmad JS & Baker R. 1987. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 358-362.
- Aikawa J, Yamashita T, Nishiyama M, Horinouchi S & Beppu T. 1990. Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of *Mucor pusillus* produced by recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* 265: 13955-13959.
- Albery WJ, Hutchins JEC & Uttamlal M. 1996. An L-amino acid electrode for monitoring beer fermentation. *J. Appl. Electrochem.* 26: 243-248.
- Altomare C, Norvell WA, Björkman T & Harman GE. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2926-2933.
- Archer DB, MacKenzie DA, Jeenes DJ & Roberts IN. 1992. Proteolytic degradation of heterologous proteins expressed in *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 14: 357-362.
- Archer DB & Peberdy JF. 1997. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 273-306.
- Arst HN, Tollervey D, Dowzer CEA & Kelly JM. 1990. An inversion truncating the *creA* gene of *Aspergillus nidulans* results in carbon catabolite derepression. *Mol. Microbiol.* 4: 851-854.
- Baek JM, Howell CR & Kenerly CM. 1999. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* 35: 41-50.
- Bailey & Lumsden, 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 185-204. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres.
- Bamforth CW. 1980. The adaptability, purification and properties of exo- β -1,3-glucanase from the fungus *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 191: 863-866.
- Barak R, Elad Y, Mirelman D & Chet I. 1985. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 75: 458-462.
- Bartnicki-García S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.

Referencias

- Bautista LF, Aleksenko A, Hentzer M, Santerre-Henriksen A & Nielsen J. 2000. Antisense silencing of the *creA* gene in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4579-4581.
- Belshaw NJ, Hakola S, Nevalainen H, Penttilä M, Suominen P & Archer DB. 1997. *Trichoderma reesei* sequences that bind to the nuclear matrix enhance transformation frequency. *Mol. Gen. Genet.* 256: 18-27.
- Benítez T, Limón MC, Delgado-Jarana J & Rey M. 1998b. Glucanolytic and other enzymes and their genes. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 101-127. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres.
- Benítez T, Villa TG, Notario V & García-Acha I. 1976. Studies of walls of *Trichoderma viride* using fluorescent brighteners. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67: 485-489.
- Benítez T, Delgado-Jarana J, Rincón A, Rey M & Limón MC. 1998b. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. *Recent Res. Devel. in Microbiol.* 2: 129-150.
- Berka RM, Ward M, Wilson LJ, Hayenga KJ, Kodama KH, Carlomagno LP & Thompson SA. 1990. Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*. *Gene* 86: 153-162.
- Billard P, Ménart S, Blaisonneau J, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H & Wésolowski-Louvel M. 1996. Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*. role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J. Bacteriol.* 178: 5860-5866.
- Björkman T, Blanchard LM & Harman GE. 1998. Growth enhancement of *shrunk2* (*sh2*) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 35-40.
- Boller T & Mauch F. 1988. Colorimetric assay for chitinase. *Methods Enzymol.* 161: 430-435.
- Bom IJ, Dielbandhoosing SK, Harvey KN, Comes SJCM, Klis FM & Brul S. 1998. A new tool for studying the molecular architecture of the fungal cell-wall: one-step purification of recombinant *Trichoderma* β -(1-6)-glucanase expressed in *Pichia pastoris*. *Biochim. Biophys. Acta* 1425: 419-424.
- Brenes A, Guenter W, Marquardt RR & Rotter BA. 1993. Effect of β -glucanase/pentosanase enzyme supplementation on the performance of chickens and laying hens fed wheat, barley, naked oats and rye diets. *Can. J. Anim. Sci.* 73: 941-951.
- Bulat SA, Lübeck M, Ko NM, Jensen DF & Lübeck PS. 1998. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Mycol. Res.* 102: 933-943.

Referencias

- Bussey H. 1988. Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. *Yeast* 4:17-26.
- Caddick MX, Brownlee AG & Arst HN. 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 203: 346-353.
- Calderón J, Olvera L, Martínez LM & Dávila G. 1997. A *Neurospora crassa* mutant altered in the regulation of L-amino acid oxidase. *Microbiology* 143: 1969-1974.
- Carsolio C, Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutiérrez A, Chet I & Herrera-Estrella A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 929-935.
- Carsolio C, Gutiérrez A, Jiménez B, Van Montagu M & Herrera-Estrella A. 1994. Characterization of *ech42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10903-10907.
- Cenis JL. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20: 2380.
- Cid VJ, Duran A, Del Rey F, Snyder MP, Nombela C & Sánchez M. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 59: 345-386.
- Colombo S, Ma P, Cauwenber L, Winderickx J, Crauwels M, Teunissen A, Nauwelaers D, de Winde JH, Gorwa MF, Colavizza D & Thevelein JM. 1998. Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 3326-3341.
- Coons DM, Vagnoli P & Bisson LF. 1997. The C-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of *snf3* null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: *SNF3* functions in glucose recognitions. *Yeast* 13: 9-20.
- Cortés C, Gutiérrez A, Olmedo V, Inbar J, Chet I, Herrera-Estrella A. 1998. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Mol. Gen. Genet.* 260: 218-225.
- Cubero B & Scazzocchio C. 1994. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 13: 407-415.
- Curti B, Ronchi S & Simonetta PM. 1992. D- and L-amino acid oxidases. En *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes Vol III*, pp 69-94. F Müller (ed.). CRC Press.

Referencias

- Chester CGC & Bull AT. 1963. The enzymic degradation of laminarin. *Biochem. J.* 86: 28-31.
- Chet I, Benhamou N & Haran S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 153-172. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres.
- Chiang TY & Marzluf GA. 1994. DNA recognition by the NIT2 nitrogen regulatory protein: importance of the number, spacing, and orientation of GATA core elements and their flanking sequences upon NIT2 binding. *Biochemistry* 33: 576-582.
- Chiba Y, Nakajima T & Matsuda K. 1988. A morphological mutant of *Neurospora crassa* with defects in the cell wall β -glucan structure. *Agric. Biol. Chem.* 52: 3105-3111.
- Chomzynski P & Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Chrispeels MJ & Sadava DE. 1994. Plants, genes, and agriculture. Jones and Bartlett Publishers. Londres.
- Chu CC & Paul WE. 1997. *Fig1*, an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2507-2512.
- Dana MM, Limón MC, Mejías R, Mach RL, Benítez T, Pintor-Toro JA & Kubicek CP. 2001. Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* 38: 335-342.
- Danielson RM & Davey CB. 1973a. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil. Biol. Biochem.* 5: 485-494.
- Danielson RM & Davey CB. 1973b. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil. Biol. Biochem.* 5: 495-504.
- Danielson RM & Davey CB. 1973c. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil. Biol. Biochem.* 5: 505-515.
- Davis D, Wilson RB & Mitchell AP. 2000. RIM101-Dependent and -independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 971-978.
- De Azevedo AMC, De Marco JL & Félix CR. 2000. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *FEMS Microbiol. Lett.* 188: 171-175.

Referencias

- De la Cruz J, Hidalgo-Gallego A, Lora JM, Benítez T, Pintor-Toro JA & Llobell A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 206: 859-867.
- De la Cruz J, Rey M, Lora JM, Hidalgo-Gallego A, Domínguez F, Pintor-Toro JA, Llobell A & Benítez T. 1993. Carbon source control on β -glucanases, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. Arch. Microbiol. 159: 316-322.
- De la Cruz J & Llobell A. 1999. Purification and properties of a basic endo- β -1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 265: 145-151.
- De la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benítez T & Llobell A. 1995a. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. J. Bacteriol. 177: 1864-1871.
- De la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benítez T, Llobell A & Romero LC. 1995b. A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. J. Bacteriol. 177: 6937-6945.
- De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y & Höfte M. 1998. Induce systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. 104: 279-286.
- Dean JFD, Gamble HR & Anderson JD. 1989. The ethylene biosynthesis-inducing xylanase: its induction in *Trichoderma viride* and certain plant pathogens. Phytopathology 79: 1071-1078.
- Del Rey F, García-Acha I & Nombela C. 1979. The regulation of β -glucanase synthesis in fungi and yeast. J. Gen. Microbiol. 110: 83-89.
- Delgado-Jarana J, Pintor-Toro JA & Benítez T. 2000a. Overproduction of β -1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. Biochim. Biophys. Acta 1481: 289-296.
- Delgado-Jarana J, Moreno MA & Benítez T. 2000b. Isolation of genes from *Trichoderma harzianum* CECT 2413 expressed at different pHs. 6th IOBC/WPRS-EFPP Biocontrol Workshop. Sevilla. España.
- Denison SH, Orejas M & Arst HN. 1995. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. J. Biol. Chem. 270: 28519-28522.
- Denison SH, Negrete-Uratsun S, Mingot JM, Tilburn J, Mayer MA, Goel A, Espeso EA, Peñalva MA & Arst HN. 1998. Putative membrane components of signal transduction

Referencias

- pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* 30: 259-264.
- Denison SH. 2000. pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal. Genet. Biol.* 29: 61-71.
- Di Pietro A, Lorito M, Hayes CK, Broadway RM & Harman GE. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83: 308-313.
- Dowzer CEA & Kelly JM. 1991. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5701-5709.
- Drysdale MR, Kolze SE & Kelly JM. 1993. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene* 130: 241-245.
- Dubordieu D, Desplanques C, Villettaz JC & Ribereau-Gayon P. 1985. Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydr. Res.* 144: 277-287.
- Dunn-Coleman NS, Bloebaum P, Berka RM, Bodie E, Robinson N, Armstrong G, Ward M, Przetak M, Carter GL, LaCost R, Wilson LJ, Kodama KH, Baliu EF, Bower B, Lamsa M & Heinsohn H. 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Bio/Tecnology* 9: 976-981.
- Dunne CP. 1982. Relationship between extracellular proteases and the cellulase complex of *Trichoderma reesei*. *Enz. Eng.* 6: 355-356.
- Durand-Poussereau N & Fevre M. 1996. Characterization of a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production. *J. Biotechnol.* 51: 97-105.
- Eggink G, Engel H, Vriend G, Terpstra P & Witholt B. 1990. Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J. Mol. Biol.* 212: 135-142.
- Elad Y & Kapat A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 177-189.
- Elad Y, Chet I & Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28: 719-725.
- Elad Y, Chet I, Boyle P & Henis Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*- Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73: 85-88.

Referencias

- Espeso EA, Tilburn J, Arst HN & Peñalva MA. 1993. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* 12: 3947-3956.
- Espeso EA, Tilburn J, Sánchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN & Peñalva MA. 1997. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor pacC. *J. Mol. Biol.* 274: 466-480.
- Espeso EA, Roncal T, Díez E, Rainbow L, Bignell E, Álvaro J, Suárez T, Denison SH, Tilburn J, Arst HN & Peñalva MA. 2000. On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* 19: 719-728.
- Estruch EA & Carlson M. 1993. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3872-3881.
- Fincham JRS. 1989. Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* 53: 148-170.
- Flores A, Chet I & Herrera-Estrella A. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr. Genet.* 31: 30-37.
- Friebe B & Holldorf AW, 1975. Control of extracellular β -1,3-glucanase activity in a basidiomycete species. *J. Bacteriol.* 122: 818-825.
- Froeliger EH & Carpentier BE. 1996. *NUT1*, a major nitrogen regulatory gene in *Magnaporthe grisea*, is dispensable for pathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* 251: 647-656.
- Fu Y & Marzluf GA. 1990. *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1056-1065.
- Fuglsang CC, Berka RM, Wahleithner JA, Kauppinen S, Shuster JR, Rasmussen G, Halkier T, Dalboge H & Henrissat B. 2000. Biochemical analysis of recombinant fungal mutanases. *J. Biol. Chem.* 275: 2009-2018.
- Gancedo JM. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.
- Ganga A, González-Candelas L, Ramón D & Pérez-González JA. 1997. Glucose-tolerant expression of *Trichoderma longibrachiatum* endoglucanase I, an enzyme suitable for use in wine production. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 2359-2362.
- García I, Lora JM, De la Cruz J, Benítez T, Llobell A & Pintor-Toro JA. 1994. Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* 27: 83-89.

Referencias

- Gente S, Billon-Grand G, Poussereau N & Fèvre M. 2001. Ambient alkaline pH prevents maturation but not synthesis of ASPA, the aspartyl protease from *Penicillium roqueforti*. *Curr. Genet.* 323-328.
- Gente S, Durand-Pussereau N & Fèvre M. 1997. Controls of the expression of *aspA*, the aspartyl protease gene from *Penicillium roqueforti*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 557-565.
- Geremía RA, Goldman GH, Jacobs D, Ardiles W, Vila SB, Van Montagu M & Herrera-Estrella A. 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8: 603-613.
- Gielkens M, González-Candelas L, Sánchez-Torres P, van de Vondervoort P, de Graaff L, Visser J & Ramón D. 1999. The *abfB* gene encoding the major a-L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strains. *Microbiology* 145: 735-741.
- Glenn M, Ghosh A & Ghosh BK 1985. Subcellular fractionation of a hypercellulolytic mutant, *Trichoderma reesei* Rut-C30: localization of endoglucanase in microsomal fraction. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1137-1143.
- Goldman GH, Pellizzon CH, Marins M, McInerney JO & Goldman MHS. 1998. *Trichoderma* spp. genome and gene structure. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 1*, pp 209-224. CP Kubicek and GE Harman (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres.
- Goldman GH, Van Montagu M & Herrera-Estrella A. 1990. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr. Genet.* 17: 169-174.
- Goller SP, Gorfer M & Kubicek CP. 1997. *Trichoderma reesei prs12* encodes a stress- and unfolded-protein-response-inducible regulatory subunit of the fungal 26S proteasome. *Curr. Genet.* 33: 284-290.
- Görner W, Drchschlag E, Martínez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H & Schüller C. 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Dev.* 12: 586-597.
- Gouka RJ, Punt PJ & Van den Hondel CAMMJ. 1997a. Glucoamylase gene fusions alleviate limitations for protein production in *Aspergillus awamori* at the transcriptional and (post) translational levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 488-497.
- Gouka RJ, Punt PJ & Van den Hondel CAMMJ. 1997b. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 1-11.
- Gouka RJ, Punt PJ, Hessing JGM & Van den Hondel CAMMJ. 1996. Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1951-1957.

Referencias

- Gould GW & Seater MJ. 1997. Introduction to the facilitative glucose transporter family. En *Facilitative Glucose Transporter*, pp 1-38. GW Gould (ed.). Chapman & Hall. Nueva York.
- Griffin DH. 1994. *Fungal Physiology*, 2^a ed. Wiley-Liss, Nueva York.
- Haab D, Hagspiel K, Szakmary K & Kubicek CP. 1990. Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. *J. Biotechnol.* 16: 187-198.
- Haas H, Bauer B, Redl B, Stöffer G & Marzluf GA. 1995. Molecular cloning and analysis of *nre*, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 27: 150-158.
- Hagspiel K, Haab D & Kubicek CP. 1989. Protease activity and proteolytic modification of cellulases from a *Trichoderma reesei* QM 9414 selectant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 61-67.
- Haran S, Schickler H, Oppenheim A & Chet I. 1995. New components of the chitinolytic systems of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 99: 441-446.
- Haran S, Schickler H, Pe'er S, Logemann S, Oppenheim A & Chet I. 1993. Increased constitutive chitinase activity in transformed *Trichoderma harzianum*. *Biol Control* 3: 101-108.
- Haran S, Schickler H & Chet I. 1996a. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiol.* 142: 2321-2331.
- Haran S, Schickler H, Oppenheim A & Chet I. 1996b. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980-985.
- Harkki A, Mäntylä A, Penttilä M, Mutttilainen S, Buhler R, Suominen P, Knowles JC & Nevalainen H. 1991. Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 227-233.
- Harman GE, Hayes CK, Lorito M, Broadway RM, Di Pietro A, Peterbauer C & Tronsmo A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-318.
- Harman GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-393.
- Hasegawa S & Nordin JH. 1969. Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. *J. Biol. Chem.* 244: 5460-5470.

Referencias

- Hawkins AR, Lamb HK, Smith M, Keyte JW & Roberts CF. 1988. Molecular organisation of the quinic acid utilization (QUT) gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 214: 224-231.
- Hens M, Arst HN, Aufavre-Brown A & Holden DW. 1998. The role of the *Aspergillus fumigatus areA* gene in invasive pulmonary aspergillosis. Mol. Gen. Genet. 258: 553-557.
- Herrera-Estrella A, Goldman GH & Van Montagu M. 1990. High-efficiency transformation system for the biocontrol agents *Trichoderma* spp. Mol. Microbiol. 4: 839-843.
- Hijarrubia MJ, Casqueiro J, Gutiérrez S, Fernández FJ & Martín JF. 1997. Characterization of the *bip* gene of *Aspergillus awamori* encoding a protein with an HDEL retention signal homologous to the mammalian BiP involved in polypeptide secretion. Curr. Genet. 32: 139-146.
- Hiura N, Nakajima T & Matsuda K. 1987. Purification and some properties of an endo- β -1,6-glucanase from *Neurospora crassa*. Agric. Biol. Chem. 51: 3315-3321.
- Hjeljord L & Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 131-152. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres.
- Holwerda BC & Rogers JC. 1992. Purification and characterization of aleurain. A plant thiol protease functionally homologous to mammalian cathepsin H. Plant Physiol. 99: 848-855.
- Howell CR. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 173-184. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres.
- Ilmén M, Thrane Ch & Penttilä. 1996a. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. Mol. Gen. Genet. 251: 451-460.
- Ilmén M, Onnela ML, Klemsdal S, Keränen S & Penttilä. 1996b. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Mol. Gen. Genet. 253: 303-314.
- Inbar J & Chet I. 1992. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon. J. Bacteriol. 174: 1055-1059.
- Inbar J & Chet I. 1994. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. Microbiology 140: 651-657.

Referencias

- Inbar J & Chet I. 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 141: 2823-2829.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K & Kimura A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.
- Jarai G & Buxton F. 1994. Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.* 26: 238-244.
- Jeenes DJ, MacKenzie DA, Roberts IN & Archer DB. 1991. Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9: 327-367.
- Jeuniaux C. 1966. Chitinases. *Methods Enzymol.* 8: 644-650.
- Jones RW & Hancock JG. 1988. Mechanism of gliotoxin action and factors mediating gliotoxin sensitivity. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2067-2075.
- Joutsjoki VV, Torkkeli TK & Nevalainen H. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24: 223-228.
- Joutsjoki. 1994. Construction by one-step gene replacement of *Trichoderma reesei* strains that produce the glucoamylase P of *Hormoconis resinae*. *Curr. Genet.* 26: 422-429.
- Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, De la Cruz J, Llobell A, Douwes JE, Shimoi H, Lipke PN & Klis FM. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3- β -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* 6: 337-345.
- Kapteyn JC, Ram AFJ, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van den Ende H, Llobell A, Cabib E & Klis FM. 1997. Altered extent of cross-linking of β 1,6-glycosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β 1,3-glucan content. *J. Bacteriol.* 179: 6279-6284.
- Karhunen T, Mäntylä A, Nevalainen KMH & Suominen PL. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I Endoglucanase I overproduction. *Mol. Gen. Genet.* 241: 515-522.
- Kelly JM & Hynes MJ. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 4: 475-479.
- Kindermann J, El-Ayouri Y, Samuels GJ & Kubicek CP. 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genet. Biol.* 24: 298-309.

Referencias

- Kitamoto Y, Kono R, Shimotori A, Mori N & Ichikawa Y. 1987. Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Agric. Biol. Chem. 51: 3385-3386.
- Kollár R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJC, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. J. Biol. Chem. 272: 17762-17775.
- Kruszewska JS, Butterweck AH, Kurzatkowski W, Migdalski A, Kubicek CP & Palamarczyk G. 1999a. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosylphosphodolichol synthase-encoding gene in *Trichoderma reesei* results in an increased level of protein secretion and abnormal cell ultrastructure. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2382-2387.
- Kruszewska JS, Palamarczyk G & Kubicek CP, 1990. Stimulation of exoprotein secretion by choline and tween 80 in *Trichoderma reesei* QM 9414 correlates with increased activities of dolichol phosphate mannose synthase. J. Gen. Microbiol. 136: 1293-1298.
- Kruszewska JS. 1999b. Heterologous expression of genes in filamentous fungi. Acta Biochim. Pol. 46: 181-195.
- Kubicek CP & Penttilä ME. 1998. Regulation of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 49-72. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres.
- Kubicek-Pranz EM, Gruber F & Kubicek CP. 1991. Transformation of *Trichoderma reesei* with the cellobiohydrolase II gene as a means for obtaining with increased cellulase production and specific activity. J. Biotechnol. 20: 83-94.
- Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martínez-Rossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davies RW & Arst HN. 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. EMBO J. 9: 1355-1364.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Borner T & Kubicek CP. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7755-7760.
- Kulmburg P, Mathieu M, Dowzer CEA, Kelly J & Felenbok B. 1993. Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. 7: 847-857.
- Kullnig C, Mach RL, Lorito M, Kubicek CP. 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of

Referencias

- Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2232-2234.
- Kurzatkowski W, Torronen A, Filipek J, Mach RL, Herzog P, Sowka S & Kubicek CP. 1996. Glucose-induced secretion of *Trichoderma reesei* xylanases. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2859-2865.
- Kusakabe K, Kodama K, Kuninaka A & Yoshino H. 1980. A new antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. J. Biol. Chem. 255: 976-981.
- Kusters-van Someren M, Flipphi M, de Graaff L, van den Broeck H, Kester H, Hinnen A & Visser J. 1992. Characterization of the *Aspergillus niger pelB* gene: structure and regulation of expression. Mol. Gen. Genet. 234: 113-120.
- Laemli UK, Käs E, Poljak L & Adachi Y. 1992. Scaffold associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. Curr. Opin. Genet. Dev. 2: 275-285.
- Lagunas R. 1995. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 104: 229-242.
- Lambert M, Blanchin-Roland S, Le Louedec F, Lepingle A & Gaillardin C. 1997. Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a *RIM101/pacC* homolog. Mol. Cell. Biol. 17: 3966-3976.
- Lau G & Hamer JE. 1996. Regulatory genes controlling *MPG1* expression and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 8: 771-781.
- Leal JA & Bernabé M. 1998. Taxonomic applications of polysaccharides. En *Chemical Fungal Taxonomy*, pp 153-182. JC Frisbad, PD Bridge y DK Arora (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York.
- Li W & Mitchel AP. 1997. Proteolytic activation of Rimp1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. Genetics 145: 63-73.
- Liang P & Pardee AB. 1997. Differential display methods and protocols. Methods in molecular biology Vol. 85. Humana Press Inc., Totowa. New Jersey.
- Limón MC & Benitez T. 1998. A comparative study of overexpression of chitinases in *Trichoderma harzianum*. 4th European Conference on Fungal Genetics. León. España.
- Limón MC, Lora JM, García I, De la Cruz J, Llobell A, Benitez T & Pintor-Toro JA. 1995. Primary structure and expression pattern of the 33-KDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Curr. Genet. 28: 478-483.

Referencias

- Limón MC, Pintor-Toro JA & Benítez T. 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants which overexpresses a 33 kDa chitinase. *Phytopathology* 89: 254-261.
- Limón, 1999. Quitinasas CHIT33 y CHIT42 de *Trichoderma harzianum*. Aplicaciones en el control biológico y la biotecnología. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Lora JM, De la Cruz J, Benítez T, Llobell A & Pintor-Toro JA. 1995. Molecular characterization and heterologous expression of an endo- β -1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol. Gen. Genet.* 247: 639-645.
- Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Woo SL & Harman GE. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84: 398-405.
- Lorito M, Woo SL, Ambrosio MD, Harman GE, Hayes CK, Kubicek CP & Scala F. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 9: 206-213.
- Lorito M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 73-100. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres
- Lowry OH, Rosenbrough AL, Farr RL & Randall M. 1951. Protein measurement with the foli phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MacCabe A, van den Hombergh JPTW, Tilburn J, Arst HN & Visser J. 1996. Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol. Gen. Genet.* 250: 367-374.
- MacCabe A, Orejas M, Pérez-González JA & Ramón D. 1998. Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *J. Bacteriol.* 180: 1331-1333.
- Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M & Kubicek CP. 1996. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol. Microbiol.* 21: 1273-1281.
- Mach RL & Zeilinger S. 1998. Genetic transformation of *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 1*, pp 225-242. CP Kubicek and GE Harman (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres
- Mach RL, Peterbauer CK, Payer K, Jaksits S, Woo SL, Zeilinger S, Kullnig CM, Lorito M & Kubicek CP. 1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1858-1863.

- Mach RL, Schindler M & Kubicek CP. 1994. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hydromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr. Genet.* 25: 567-570.
- Mach RL, Zeilinger S, Kristufek D & Kubicek CP. 1998. Ca²⁺-calmodulin antagonists interfere with xylanase formation and secretion in *Trichoderma reesei*. *Biochim. Biophys. Acta* 1403: 281-289.
- Madi L, McBride SA, Bailey LA & Ebbole DJ. 1997. *rco-3*, a gene involved in glucose transport and conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 146: 499-508.
- Mäntylä A, Paloheimo M & Suominen P. 1998. Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 289-310. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres
- Mäntylä A, Saarelainen R, Fagerström R, Suominen P & Nevalainen H. 1994. Cloning of the aspartic protease gene of *Trichoderma reesei*. 2nd European Conference on Fungal Genetics. Lunteren. Holanda.
- Margolles-Clark E, Hayes CK, Harman GE & Penttilä M. 1996. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2145-2151.
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H & Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* 15: 2227-2235.
- Marzluf GA. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 17-32.
- Meinander NQ & Hahn-Hägerdal B. 1997. Influence of cosubstrate concentration on xylose conversion by recombinant, *XYL1*-expressing *Saccharomyces cerevisiae*: a comparison of different sugars and ethanol as cosubstrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1959-1964.
- Migheli Q, González-Candelas L, Dealessi L, Camponogara A & Ramón D. 1998. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the β -1,4-endoglucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Phytopathology* 88: 673-677.
- Mingot JM, Tilburn J, Díez E, Bignell E, Orejas M, Widdick DA, Sarkar S, Brown CV, Cadick MX, Espeso MA, Arst HN & Peñalva MA. 1999. Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the



Referencias

- processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1390-1400.
- Montenecourt BS. 1983. *Trichoderma reesei* cellulase. *Trends Biotechnol.* 1: 156-161.
- Montero M, Rey M, González F, Sanz L, Monte E & Llobell A. 2000. β -1,6-glucanase isozyme systema in *Trichoderma harzianum*. Isolation of two new genes coding for proteins with β -1,6-endoglucanase activity. 6th IOBC/WPRS-EFPP Biocontrol Workshop. Sevilla. España.
- Montijn RC, Wink E, Müller WH, Verkleij AJ, van den Ende H, Herissat B & Klis FM. 1999. Localization of synthesis of β 1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* 181: 7414-7420.
- Moralejo FJ, Cardoza RE, Gutiérrez S & Martín JF. 1999. Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1168-1174.
- Moralejo FJ, Cardoza RE, Gutiérrez S, Sisniega H, Faus I & Martín JF. 2000. Overexpression and lack of degradation of thaumatin in an aspergillopepsin A-defective mutant of *Aspergillus awamori* containing an insertion in the *pepA* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 772-777.
- Moskvina E, Imre EM & Ruis H. 1999. Stress factors acting at the level of the plasma membrane induce transcription via the stress response element (STRE) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 32: 1263-1272.
- Mueckler M. 1994. Facilitative glucose transporter. *Eur. J. Biochem.* 219: 713-725.
- Mulenga DK & Berry DR. 1994. Isolation and characterization of a unique endo- β -1,6-glucanase from the yeast *Saccharomycopsis fibuligera* NCYC 451. *Microbios* 80: 143-154.
- Nakari-Setälä T & Penttilä M. 1995. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3650-3655.
- Neethling D & Nevalainen H. 1996. Mycoparasitic species of *Trichoderma* produce lectins. *Can. J. Microbiol.* 42: 141-146.
- Negrete-Urtasun S, Denison SH & Arst HN. 1997. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *pala* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* 179: 1832-1835.

Referencias

- Negrete-Urtasun S, Reiter W, Diez E, Denison SH, Tilburn J, Espeso EA, Peñalva MA & Arst HN. 1999. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.* 33: 994-1003.
- Nelson NJ. 1957. Colorimetric analysis of sugars. *Methods. Enzymol.* 3: 85-86
- Nevalainen H & Penttilä M. 1995. Molecular Biology of cellulolytic fungi. . En *The Mycota II: Biochemistry and Molecular Biology*, pp 303-319. U. Kück (ed). Springer-Verlag. Berlin.
- Niederman DM & Lerch K. 1991. Molecular cloning of the L-amino-acid oxidase gene from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 265: 17246-17251.
- Niederman DM & Lerch K. 1991. Regulation of biosynthesis of L-amino acid oxidase by *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 79: 309-314.
- Noronha EF & Ulhoa CJ. 1996. Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 42: 1039-1044.
- Noronha EF & Ulhoa CJ. 2000. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 119-123.
- North MJ. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiol. Rev.* 46: 308-340.
- Nyssonen E, Penttilä M, Harkki A, Saloheimo A, Knowles JKC & Keränen S. 1993. Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 11: 591-595.
- Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN & Peñalva MA. 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes & Dev.* 9: 1622-1632.
- Orejas M, MacCabe AP, Pérez-González JA, Kumar S & Ramón D. 1999. Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans xlnA* gene. *Mol. Microbiol.* 31: 177-184.
- Özcan S & Johnston M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporter. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 554-569.
- Özcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wölf S & Johnston M. 1996. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 12428-12432.

Referencias

- Özcan S, Dover J & Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 2566-2573.
- Pan SQ, Ye X & Kuc J. 1989. Direct detection of b-1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Anal. Biochem.* 182: 136-140.
- Paoletti M, Clave C & Buegueret J. 1998. Characterization of a gene from the filamentous fungus *Podospora anserina* encoding an aspartyl protease induced upon carbon starvation. *Gene* 210: 45-52.
- Papavizas GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathology* 23: 23-54.
- Pawelek PD, Cheah J, Coulombe R, Macheroux P, Ghisla S & Vrienslink. 2000. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *EMBO J.* 19: 4204-4215.
- Peberdy JF. 1994. Protein secretion in filamentous fungi- trying to understand a highly productive black box. *Trends Biotechnol.* 12: 50-57.
- Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E & Knowles J. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61: 155-164.
- Penttilä M. 1998. Heterologous protein production in *Trichoderma*. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 2*, pp 365-382. GE Harman and CP Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres
- Peterbauer CK, Lorito M, Hayes CK, Harman GE & Kubicek CP. 1996. Molecular cloning and expression of the *nagl* gene (N-acetyl- β -D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Curr. Genet.* 30: 325-331.
- Peterbauer CK, Brunner K, Mach RL & Kubicek CP. 2000. Analysis of protein-DNA interaction in the *nagl* (N-acetyl-D-glucosaminidase) promoter of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride*. 5th European Conference on Fungal Genetics. Arcachon. Francia.
- Pitson SM, Seviour RJ & McDougall BM. 1993. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 178-192.
- Pitson SM, Seviour RJ & McDougall BM. 1996b. Proteolytic inactivation of an extracellular (1-3)- β -glucanase from the fungus *Acremonium persicinum* is associated with growth at neutral or alkaline medium pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 287-293.

Referencias

- Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM, Stone BA & Sadek M. 1996. Purification and characterization of an extracellular (1-6)- β -D-glucanase from the filamentous fungus *Acremonium presicinum*. *Biochem. J.* 316: 841-846.
- Pitts JE. 1992. Crystallization by centrifugation. *Nature* 355: 117.
- Pönitz J & Roos W. 1994. A glucose-activated electron transfer system in the plasma membrane stimulates the H⁺-ATPase in *Penicillium cyclopium*. *J. Bacteriol.* 176: 5429-5438.
- Porta A, Ramón AM & Fonzi WA. 1999. PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* pafF, controls pH dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181: 7516-7523.
- Prieto A, Leal JA, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Gómez-Miranda B, Domenech J, Ahrazem O & Bernabé M. 1997. Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. *Carbohydr. Res.* 304: 281-291.
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH & Van den Hondel CAMJJ. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124.
- Punt PJ, Zegers ND, Busscher M, Pouwels PH & van den Hondel CAMJJ. 1991. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. *J. Biotechnol.* 17: 19-34.
- Quivey RG & Kriger PS. 1993. Raffinose-induced mutanase production from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 112: 307-312.
- Radford A, Stone PJ & Taleb F. 1996. Cellulase and amylase complexes. En *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*, pp 269-291. R Brambl & GA Marzluf (eds). Springer-Verlag. Berlin.
- Raibekas AA & Massey V. 1998. Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced FIG1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*: 248: 476-478.
- Ramón AM, Porta A & Fonzi WA. 1999. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the pacC-related transcription factor encoded by PRR2. *J. Bacteriol.* 181: 7524-7530.
- Rapp P. 1989. 1,3- β -glucanase, 1,6- β -glucanase and β -glucosidase activities of *Sclerotium glaucanicum*: synthesis and properties. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2847-2858.

Referencias

- Ravagnani A, Gorfinkiel L, Langdon T, Diallinas G, Adjadj E, Demais S, Gorton D, Arst HN & Scazzocchio. 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.
- Rawlings ND & Barrett AJ. 1995. Families of Aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol.* 248: 105-120.
- Reese ET & Mandels M. 1959. β -D-1,3-glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.* 5: 173-185.
- Reese ET, Parrish FW & Mandels M. 1961. β -D-1,2-glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.* 7: 309-317.
- Reese ET, Parrish FW & Mandels M. 1962. β -D-1,6-glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.* 8: 327-334.
- Reifenberger E, Boles E & Ciriacy M. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanism of glucose repression.
- Reissig JL, Strominger JL & Leloir LF. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217: 959-966.
- Rey M, Delgado-Jarana J & Benítez T. 2001. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (en prensa).
- Rey M, Ohno S, Pintor-Toro JA, Llobell A & Benítez T. 1998. Unexpected homology between inducible cell wall protein QID74 of filamentous fungi and BR3 salivary protein of the insect *Chironomus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6212-6216.
- Rifai MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers* 1-56.
- Rincón A & Benítez T. 2000. Improved antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants. 5th European Conference on Fungal Genetics. Arcachon. Francia.
- Rombouts FM & Phaff HJ. 1976. Lysis of yeast cell walls. Lytic β -(1-6)-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. *Eur. J. Biochem.* 63: 109-120.
- Ronne H. 1995. Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11: 12-17.
- Ruijter GJG & Visser J. 1997. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 103-114.

Referencias

- Ruijter GJG, Vanhanen SA, Gielkens MMC, van de Vondervoort PJI & Visser J. 1997. Isolation of *Aspergillus niger creA* mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzymes. *Microbiology* 143: 2991-2998.
- Ruis H & Schüller C. 1995. Stress signaling in yeast. *BioEssays* 17: 959-965.
- Saarelainen T, Paloheimo M, Fagerström R, Suominen P & Nevalainen H. 1993. Cloning, sequencing and enhanced expression of the *Trichoderma reesei* endoxylanase II (pl 9) gene *xln2*. *Mol. Gen. Genet.* 241: 497-503.
- Saloheimo M, Lund M & Penttilä ME. 1999. The protein disulphide isomerase of the fungus *T. Reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. *Mol. Gen. Genet.* 262: 35-45.
- Salovuori I, Makarow M, Rauvala H, Knowles J & Kääriäinen L. 1987. Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 5: 152-156.
- Samuels GJ. 1996. *Trichoderma* a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100: 923-935.
- Sánchez-Torres P, González R, Pérez-González JA, González-Candelas L & Ramón D. 1994. Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *eglI* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 440-446.
- Sano K, Amemura A & Harada T. 1975. Purification and properties of a β -(1,6)-glucosidase from *Flavobacterium*. *Biochim. Biophys. Acta* 377: 410-420.
- Santos T, Nombela C, Villanueva JR & Larriba G. 1979. Characterization and synthesis regulation of *Penicillium italicum* 1,6- β -glucanase. *Arch. Microbiol.* 121: 265-270.
- Santos T, Villanueva JR & Nombela C. 1977. Production of catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanases. *J. Bacteriol.* 129: 52-58.
- Schep GP, Shepherd MG & Sullivan PA. 1984. Purification and properties of a β -(1,6)-glucanase from *Penicillium brefeldianum*. *Biochem. J.* 223: 707-714.
- Schiestl RS & Gietz RD. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16: 339-346.
- Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac K, Scala F, Harman GE & Kubicek CP. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics: molecular mechanisms involved in the antagonistic action of

Referencias

- Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4364-4370.
- Screen S, Bailey A, Chandley K, Cooper R & Clarkson J: 1997. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve trans-acting DNA binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CreA protein. Curr. Genet. 31: 511-518
- Shibata Y & Fukimbara T. 1973. A β -1,6-glucan 6-glucanohydrolase from *Gibberella fujikuroi*. J. Ferment. Technol. 51: 216-226.
- Siderius M & Mager WH. 1997. General stress response: in search of a common denominator. En *Yeast Stress Response*, pp 213-230. S Hohmann & WH Mager (eds.). Springer. Berlin.
- Sikora L & Marzluf GA. 1982. Regulation of L-amino acid oxidase and of D-amino acid oxidase in *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. 186: 33-39.
- Sivan A & Harman GE. 1991. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol. 137: 23-29.
- Sivasithamparam K & Guisalberti EL. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma & Gliocladium Vol. 1*, pp 139-192. CP Kubicek and GE Harman (eds.). Taylor & Francis Ltd. Londres.
- Snoeijs SS, Vossen P, Goosen T, van den Broek HWJ & de Wilt PJGM. 1999. Transcription of the avirulence gene Avr9 of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by a GATA-type transcription factor in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 261: 653-659.
- Soler A, De la Cruz J & Llobell A. 1999. Detection of β -1,6-glucanase isozymes from *Trichoderma* strains in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing. J. Microbiol. Methods 35: 245-251.
- Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Sousa S, Rey M & Llobell A. 2000. Homologous and heterologous overexpression of a beta-1,6-glucanase (BGN16.3) from *Trichoderma harzianum*. 6th IOBC/WPRS-EFPP Biocontrol Workshop. Sevilla. España.
- Souza DHF, Eugenio LM, Fletcher JE, Jian M, Garrat RC, Oliva G & Selistre-de-Araujo H. 1999. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. Arch. Biochem. Biophys. 368: 285-290.

Referencias

- St. Leger RJ, Nelson JO & Screen SE. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology* 145: 2691-2699.
- St. Leger RJ, Joshi L & Roberts D. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* 143: 1983-1992.
- St. Leger RJ, Joshi L & Roberts D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 709-713.
- St. Leger RJ. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J. Bot.* 73: 1119S-1125S.
- Strauss J, Horvath KK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL & Kubicek CP. 1995. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol. Microbiol.* 32: 169-178.
- Suárez T & Peñalva MA. 1996. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* 20: 529-540.
- Suárez B, Rey M, Monte E & Llobell A. 2000. Purification and characterization of a protease, Pra1, from *Trichoderma harzianum* with affinity for fungal cell walls. 6th IOBC/WPRS-EFPP Biocontrol Workshop. Sevilla. España.
- Suhr SM & Kim DS. 1996. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 224: 134-139.
- Suominen P, Mäntylä AL, Karhunen T, Hakola S & Nevalainen H. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. *Mol. Gen. Genet.* 241: 523-530.
- Takashima S, Nakamura A, Iikura H, Masaki H & Uozumi T. 1996a. Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from *Trichoderma reesei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 173-176.
- Takashima S, Iikura H, Nakamura A, Masaki H & Uozumi T. 1996b. Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei cbh1* upstream region. *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 361-366.
- Tangarone B, Royer JC & Nakas JP. 1989. Purification and characterization of an endo-1,3- β -D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 177-184.

Referencias

- Then Berg K & Brakhage AA. 1998. Regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *acvA* (*pcbAb*) by amino acids: implication for involvement of transcription factor *pacC*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 843-849.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA & Arst HN. 1995. The *Aspergillus* *PacC* zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline- expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14: 779-790.
- Tori S, Naito M & Tsuruo T. 1997. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom. *J. Biol. Chem.* 272: 9539-9542.
- Tréton B, Blanchin-Roland S, Lambert M, Lépingle A & Gaillardin C. 2000. Ambient pH signalling in ascomycetous yeasts involves homologues of the *Aspergillus nidulans* genes *palF* and *palH*. *Mol. Gen. Genet.* 263: 505-513.
- Tsunoda A, Nagaki T, Sakano Y & Kobayashi T. 1977. Purification and properties of an exo- α -1,3-glucanase from *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.* 41: 939-943.
- Tudzynski B, Homann V, Feng B & Marzluf GA. 1999. Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 106-114.
- Tudzynski B, Liu S & Kelly J. 2000. Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea* *creA* genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 184: 9-15.
- van den Hombergh JPTW, Sollewijn Gelpke MD, van de vondervoort PJI, Buxton FP & Visser J. 1997a. Disruption of three acid proteases in *Aspergillus niger*. Effects on protease spectrum, intracellular proteolysis, and degradation of target proteins. *Eur. J. Biochem.* 247: 605-613.
- van den Hombergh JPTW, van de Vondervoort PJI, Fraissinet-Tachet L & Visser J. 1997b. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol.* 15: 256-263.
- Vautard G, Cotton P & Fèvre M. 1999. The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus niger* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 453: 54-58.
- Veldhuisen G, Saloheimo M, Fiers MA, Punt PJ, Contreras R, Penttillä M & van den Hondel CAMJJ. 1997. Isolation and analysis of functional homologues of the secretion-related SAR1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 446-455.

Referencias

- Verdoes JC, Punt PJ & van den Hondel CAMJJ. 1995. Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 195-205.
- Verdoes JC, Punt PJ, Schrickx JM, Verseveld HW, Stouthamer AH & van den Hondel CAMJJ. 1993. Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the *glcA* gene. *Transgenic Res.* 2: 84-92.
- Visser J & Voragen AGJ (eds.). 1996. Pectins and pectinases. Proceedings of an international symposium, Wageningen. Holanda. Elsevier. Amsterdam.
- Weber E, Tonder K, Reinbothe C, Unverhau K, Weide H & Aurich H. 1994. L-Lysine α -oxidase from *Trichoderma viride* i4. Purification and characterization. *J. Basic. Microbiol.* 34: 265-276.
- Wésolowski-Louvel M, Goffrini P, Ferrero I & Fukuhara H. 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 233: 89-96.
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP & Boles E. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS lett.* 464: 123-128.
- Woo SL, Donzelli B, Scala F, Mach RL, Harman GE, Kubicek CP, Del Sorbo G & Lorito M. 1999. Disruption of *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* strain P1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 419-429.
- Yamamoto S, Kobayashi R & Nagasaki S. 1974. Purification and properties of an endo β -1,6-glucanase from *Rhizopus chinensis* R-69. *Agric. Biol. Chem.* 38: 1493-1500.
- Yamasaki Y, Elbein D & Konno H. 1995. Purification and properties of α -glucosidase from *Trichoderma viride*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2181-2182.
- Zeilinger S, Galhaup C, Payer K, Woo SL, Mach RL, Fekete C, Lorito M & Kubicek CP. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol.* 26: 131-140.

ÍNDICES

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

1. ¿Qué es <i>Trichoderma</i> ?	1
2. <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico	2
El micoparasitismo	2
La antibiosis	3
La competición por los nutrientes o el espacio	4
La solubilización y secuestro de nutrientes inorgánicos	4
La resistencia inducida en plantas	6
La inactivación de los enzimas del patógeno	7

OBJETIVOS	9
------------------	---

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados	11
1.1. Hongos filamentosos	
1.2. Levaduras	
1.3. Bacterias	
2. Vectores	11
2.1. Vectores derivados del bacteriófago lambda	
2.2. Vectores plasmídicos	
3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	14
3.1. Medio de cultivo de bacterias	
3.2. Medios de cultivo para levaduras	
3.3. Medios de cultivo de hongos filamentosos	
3.3.1. Recogida de esporas y mantenimiento	
3.3.2. Condiciones de cultivo básicas	
3.3.2.1. Para extraer ADN	
3.3.2.2. Para experimentos de inducción enzimática y regulación génica.	
4. Mantenimiento de microorganismos	17
5. Escrutinio de genotecas del fago λ -GEM [®] 11	17
5.1. Preparación de <i>E. coli</i> LE392 para transducción	



5.2. Infección de células con el bacteriófago lambda	
5.3. Aislamiento de calvas de bacteriófago en medio sólido	
5.4. Amplificación de bacteriófago en medio sólido	
6. Escrutinio de genotecas en el fago λ-ZAP®-II	18
6.1. Escisión <i>in vivo</i> mediante el sistema ExAssist/SOLR	
7. Transformación de microorganismos	20
7.1. Transformación de <i>E. coli</i>	
7.1.1. Método del CaCl ₂	20
7.1.1.1. Preparación de células competentes	
7.1.1.2. Transformación	
7.1.2. Método de TSS	21
7.1.2.1. Preparación de células competentes	
7.1.2.2. Transformación	
7.1.3. Método de electroporación	21
7.1.3.1. Preparación de células competentes	
7.1.3.2. Transformación	
7.2. Transformación de levaduras	22
7.3. Transformación de <i>T. harzianum</i>	23
7.3.1. Transformación usando el gen <i>amdS</i> como marcador	23
7.3.2. Transformación usando el gen <i>hph</i> como marcador	25
8. Extracción de ácidos nucleicos	26
8.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	26
8.2. Extracción de ADN de bacteriófagos	27
8.3. Extracción de ARN de levaduras	28
8.4. Extracción de ácidos nucleicos de <i>T. harzianum</i>	28
8.4.1. Extracción rápida de ADN genómico adecuado para PCR.	28
8.4.2. Extracción de ADN genómico	29
8.4.3. Extracción de ARN total	30
9. Manipulación de ácidos nucleicos	31
9.1. Cuantificación de ácidos nucleicos	
9.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción	
9.3. Generación de extremos romos	
9.4. Defosforilación de plásmidos	
9.5. Ligación	
9.6. Reacción en cadena de la polimerasa	
9.6.1. Reacción clásica	
9.6.2. Reacción con enzimas de alta fiabilidad	
9.6.3. Reacción para moldes largos	
9.7. Precipitación de ácidos nucleicos	

9.8. Separación de ácidos nucleicos	
9.8.1. Electroforesis de ADN	
9.8.1.1. En agarosa	
9.8.1.2. En acrilamida	
9.8.2. Electroforesis de ARN	
9.9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles	
9.9.1. Extracción con silica	
9.9.2. Extracción con fenol	
9.9.3. Extracción en minicolumnas	
9.9.4. Electroelución	
9.9.5. Extracción de ADN a partir de bandas de acrilamida	
10. Experimentos de hibridación en membrana	36
10.1. Marcaje radiactivo de sondas	36
10.2. Transferencia de ácidos nucleicos a membrana	36
10.2.1. Transferencia de ADN en geles de agarosa a membrana	
10.2.2. Transferencia de ARN en geles de agarosa a membrana	
10.2.3. Transferencia de ADN de colonias a membrana	
10.2.4. Transferencia de ADN de bacteriófagos a membrana	
10.3. Hibridación de ácidos nucleicos	38
10.3.1. Hibridación ADN-ADN	
10.3.2. Hibridación ADN-ARN	
10.4. Deshibridación de membranas	40
11. Obtención de preparados de proteínas de hongos filamentosos	40
11.1. Extractos totales	
11.2. Concentración de proteínas de sobrenadantes	
12. Cuantificación de proteínas	40
12.1. Método de Bradford	
12.2. Método de Lowry	
13. Separación de proteínas	41
13.1. Separación en geles de SDS-PAGE	
13.1.1. Preparación de geles y condiciones de electroforesis	
13.1.2. Tinción de geles con azul de Coomassie	
13.2. Separación por isoelectroenfoque	
13.3. Separación por cromatoenfoque	
13.4. Cromatografía a través de Sepharose® unida a concanavalina A	
13.5. Adsorción a pustulan	
14. Inmunodetección de proteínas en membrana	44
14.1. Transferencia por método semi seco	
14.2. Inmunodetección mediante anticuerpos conjugados a fosfatasa	

alcalina	
15. Ensayos de actividad enzimática	45
15.1. Ensayo de actividad β -glucanasa	
15.1.1. Ensayos en solución	
15.1.2. Ensayos en gel	
15.2. Ensayo de actividad quitinasa	
15.3. Ensayo de actividad proteasa	
15.3.1. Ensayos en solución	
15.3.2. Ensayos en gel	
16. Differential Display	48
16.1. Tratamiento de ARN total con ADNasa I	
16.2. Transcripción reversa de ARNm	
16.3. Amplificación por PCR	
16.4. Separación de fragmentos en PAGE 6 %	
16.5. Reamplificación de ADNc	
16.6. Northern reverse	
16.6.1. Marcaje de las sondas de ADNc	
16.6.2. Hibridación Dot-Blot	
17. Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	51
17.1. Ensayos de inhibición en medio líquido	
17.2. Ensayos de confrotación en medio sólido	

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1. Hidrolasas de <i>T. harzianum</i> . Quitinasas	53
2. Glucanasas	54
3. β -1,6-glucanasas y micoparasitismo	59
4. Sobreexpresión de hidrolasas	61

RESULTADOS

1. Obtención de cepas derivadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 que producen niveles más altos de β -1,6-glucanasa II	69
2. Las cepas que sobreproducen la proteína BGN16.2 son mejores	78

Referencias

agentes antifúngicos contra <i>Rhizoctonia solani</i> que la cepa silvestre	
3. La falta de proteína BGN16.2 en los sobrenadantes de las cepas transformadas correlaciona con la presencia de glucosa en el medio de cultivo	78
4. La proteína BGN16.2 es detectable intracelularmente aún cuando no existe en el sobrenadante	81
5. Medio de cultivo con fuentes orgánicas de nitrógeno o con pHs no ácidos dan lugar a niveles de BGN16.2 extracelular muy altos en las cepas transformadas	83
6. Aspartil-proteasas y un pH ácido son responsables de la degradación de BGN16.2	89
7. Clonación de una proteasa ácida de <i>T. harzianum</i>	91
8. Regulación de la proteasa ácida <i>papA</i>	98
9. La proteasa <i>papA</i> no parece influir en la estabilidad de BGN16.2	100

DISCUSION

1. Patrón de integración del ADN transformante y expresión del promotor <i>pki</i>	106
2. Las cepas transformadas son mejores antagonistas de <i>R. solani</i>	107
3. Producción de β -1,6-glucanasa II	108
4. El sistema proteolítico de <i>Trichoderma</i>	112
5. Clonación y regulación del gen de la proteasa PAPA	115
6. La proteasa PAPA en la sobreexpresión de BGN16.2	118

CAPITULO 2

INTRODUCCION

1. La regulación del micoparasitismo	119
2. La represión por glucosa mediada por CreA	121
3. Regulación positiva del metabolismo del nitrógeno mediada por AreA	123
4. La respuesta a estrés mediada por elementos STRE	124
5. Expresión génica regulable por el pH a través de PacC	127

RESULTADOS

1. Aislamiento de genes regulados por pH	131
2. Caracterización del clon #1	132
3. Caracterización del clon #2	139

DISCUSION

1. Aislamiento de un clon de <i>T. harzianum</i> con un alto grado de similitud con L-aminoácido oxidasas	147
2. Aislamiento y caracterización de un gen de <i>T. harzianum</i> con un alto grado de similitud con transportadores de azúcares	151

CONCLUSIONES	159
--------------	-----

REFERENCIAS	161
-------------	-----

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS DEL CAPÍTULO 1

Figura 1	69
Figura 2	70
Figura 3	71
Figura 4	72
Figura 5	73
Figura 6	74
Figura 7	75
Figura 8	75
Figura 9	76
Figura 10	77
Figura 11	80
Figura 12	81

Referencias

Figura 13	82
Figura 14	83
Figura 15	84
Figura 16	85
Figura 17	86
Figura 18	87
Figura 19	88
Figura 20	88
Figura 21	90
Figura 22	91
Figura 23	93
Figura 24	94
Figura 25	96
Figura 26	97
Figura 27	98
Figura 28	99
Figura 29	100
Figura 30	101
Figura 31	103
Figura 32	104
Figura 33	105

FIGURAS DEL CAPÍTULO 2

Figura 1	120
Figura 2	129
Figura 3	130
Figura 4	131
Figura 5	132
Figura 6	134
Figura 7	136
Figura 8	137
Figura 9	138
Figura 10	138
Figura 11	139
Figura 12	140
Figura 13	140
Figura 14	141

Referencias

Figura 15	142
Figura 16	143
Figura 17	143
Figura 18	144
Figura 19	145
Figura 20	149

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	55
Tabla 1.2	60
Tabla 1.3	76
Tabla 1.4	79
Tabla 1.5	89
Tabla 1.6	96
Tabla 1.7	102
Tabla 2.1	133
Tabla 2.2	135
Tabla 2.3	139

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

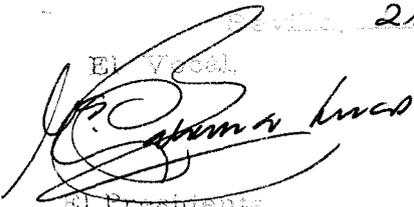
Resolución del Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

Yesús Delgado Jarana
"Producción de β -1,6-glucanasa II y genes regulados por pH en *Trichoderma harzianum*"

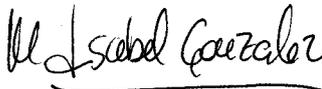
acuerdo otorgado la calificación de **SOBRESALIENTE CUM LAUDA**
POR UNANIMIDAD

Sevilla, 21 de Junio 2001

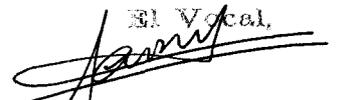
El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,



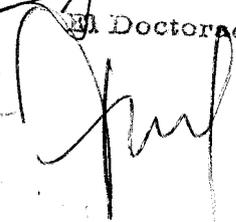
El Presidente,



El Secretario,



El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600050030