



ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Y

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA DE PLANTAS
CINVESTAV IPN UNIDAD IRAPUATO

**OBTENCIÓN DE CEPAS TRANSGÉNICAS DE DOS AISLADOS DE
Trichoderma harzianum QUE PERMITA EL ESTUDIO DEL GEN *prb1* DE
*Trichoderma atroviride***

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

QUE PRESENTA:

GÓMEZ POZAS JOHNATHAN LUDWIG

ASESOR

DR. CARLOS CORTÉS PENAGOS

MORELIA, MICH. MEXICO

NOVIEMBRE DEL 2005



ESTE TRABAJO SE LLEVÓ ACABO EN EL LABORATORIO DE
INGENIERIA GENETICA DE PLANTAS EN EL CENTRO DE
INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL (CINVESTAV IPN) UNIDAD
IRAPUATO

DEDICATORIA

A QUIEN MAS EN EL MUNDO PODRIA YO DEDICAR MIS TRIUNFOS Y MIS EXITOS EN LA VIDA SI NO ES QUE A MIS PADRES, GRACIAS POR HABERME PERMITIDO LLEGAR HASTA DONDE E LLEGADO, POR SIEMPRE ESTAR A MI LADO, POR AYUDARME CUANDO LO EH NECESITADO, POR ESAS PALABRAS Y REGAÑOS CUANDO LOS REQUERI, POR TODAS ESTAS COSAS ME SIENTO MUY AGRADECIDO Y LA VERDAD NO TENGO LAS PALABRAS PARA PLASMAR TODO LO QUE ME HAN DADO.

GRACIAS ANDRES GÓMEZ RIVERA Y MARÍA DE LOS SANTOS POZAS CEPEDA
(MIS PADRES)

POR SU PUESTO LA DEDICO TAMBIEN A MIS FAMILIARES Y A TODAS ESAS PERSONAS QUE CUANDO YO NO CREI LOGRARLO ELLAS Y ELLOS CREYERON EN MI A TODOS USTEDES MUCHAS GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

Al DR. CARLOS CORTÉS PENAGOS por aceptarme como su estudiante y darme el apoyo necesario y la oportunidad de conocer la investigación y por supuesto la confianza otorgada en mi para la realización de este proyecto de investigación (Muchas Gracias)

Al DR. ALFREDO HERRERA ESTRELLA por darme todas las facilidades y herramientas requeridas en este proyecto así como el darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio de Ingeniería Genética de Plantas en CINVESTAV IPN UNIDAD IRAPUATO

A los revisores DR CARLOS RUBEN SOSA AGUIRRE, DRA MARIA SOLEDAD VAZQUEZ GARCIDUEÑAS, Q.F.B MARTHA JOSEFINA DE LOS DOLORES TORRES por darse el tiempo de analizar esta tesis Muchas Gracias.

A mis amigos(as) de la 5ta sección y orientación farmacia de la generación (2000-2005) por siempre darme palabras de aliento y apoyarme cuando lo necesite (Miguel Ángel “Panda”, José Antonio “Pollo”, Benjamín Norman “Chamin” y Mary, Omar Arellano “Cabrito”, Juan A. Vargas, José Roberto “Guama”, Jorge Chávez “Chino”, Rudy, Luis Amezcua “Cule”, Mauricio Amezcua “Willy”, Andrés Yáñez “Nesh”, Alejandro “Hank” e Indra, Dulce Amparo, Carmen Cazorla “mi manita”, Lourdes Briseño, Carmen Ixta, Rebeca Coyoli, y si me faltan disculparan pero ya saben quienes son).

A mis amigos de Irapuato: Gustavo Carranza (Gus), Jorge Renteria (George), Ricardo Siordia (Ricky), Cesar Castillo (Chino), Leonardo Romero (Leo), Ivan Romero (Ivanovich)

A mis amigos de CINVESTAV IPN UNIDAD IRAPUATO ESPECIALMENTE a EDGARDO ULISES ESQUIVEL NARANJO y LUIS DAVID MALDONADO BONILLA por brindarme su amistad incondicional, ser mis amigos y por su valiosísima ayuda en este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

PAGINAS

RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
• Hongos como agentes de control biológico.	2
• Micoparasitismo.	3
• <i>Trichoderma</i> como un agente de control biológico.	4
• Mecanismos de la actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> .	4
• Actividades enzimáticas asociadas al micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> .	5
• El papel de <i>prb1</i> en el micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> .	6
• Elementos regulatorios del promotor <i>prb1</i> de <i>Trichoderma atroviride</i> .	7
• Genes reporteros para el análisis de expresión de promotores.	8
2. JUSTIFICACIÓN.	11
3. OBJETIVOS.	12
4. MATERIALES Y METODOS.	13
• Microorganismos.	13
• Medios de cultivo.	13
• Plásmidos.	14
• Condiciones de crecimiento.	18
• Cultivo líquido.	18
• Cultivo en medio sólido.	18
• Recolección de esporas a partir de medios sólidos.	18
• Aislamiento de DNA a partir del gel de agarosa.	18
• Método Birboin para Minipreparación de DNA de plásmido (MP).	18
• Purificación de plásmido mediante columna de QIAGEN.	19
• Extracción de DNA genómico.	19
• Análisis Southern-Blot.	20
• Transformación de las células competentes de <i>E.coli</i> mediante electroporación.	21
• Electroforesis.	21
• Transformación de <i>T. harzianum</i> por el método de Biobalística.	22
• Preparación de las partículas de tungsteno.	22
• Precipitación del DNA.	22
• Transformación por biobalística.	23
• Selección de transformantes.	23
• Transformación de <i>T. atroviride</i> por el método de polietilenglicol-CaCl ₂ .	25
• Preparación de protoplastos.	25
• Transformación por el método de polietilenglicol-CaCl ₂ .	25
• Selección de transformantes	26
• Ensayo de confrontación in vitro con <i>R. solani</i>	26
• Determinación de peso seco	27

5. RESULTADOS.	28
• Diseño de un plásmido para el análisis de expresión de <i>prb1</i> .	28
• Obtención de Transformantes de <i>T. atroviride</i> .	30
• Análisis fenotípico de las transformantes	31
• Análisis de micoparasitismo	34
• Transformación de <i>T. harzianum</i> (T-35 y YF) con el plásmido <i>pUE04</i>	35
6. DISCUSION.	36
7. CONCLUSION.	39
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	40

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	PAGINAS
Figura 1. Diversidad genética de diversos aislados de <i>Trichoderma</i> .	7
Figura 2. Promotor de <i>prb1</i> .	8
Figura 3. Detección de la actividad de GUS en una cepa transformante de <i>T. virens</i> con construcción <i>alcA-gusA</i> .	10
Figura 4. Mapa del plásmido p4.	15
Figura 5. Mapa del plásmido p4-gusA.	16
Figura 6. Mapa del plásmido pCB1004.	17
Figura 7. Representación del sistema de transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nylon.	20
Figura 8. Pistola de alta presión utilizada en biobalística.	24
Figura 9. Ensayo de confrontación.	26
Figura 10. Patrón de restricción del plásmido pUE04.	28
Figura 11. Mapa del plásmido pUE04.	29

Figura 12. Análisis Southern-blot de transformantes de <i>T.atroviride</i> .	30
Figura 13. Análisis de biomasa en <i>T. atroviride</i> y sus transformantes en medio MM.	31
Figura 14. Análisis de biomasa en <i>T. atroviride</i> y sus transformantes en medio PDB.	32
Figura 15. Evaluación del crecimiento radial en PDA de <i>Trichoderma atroviride</i> .	33
Figura 16. Evaluación de la actividad micoparasítica <i>in vitro</i> de <i>T. atroviride</i> vs <i>R. solani</i> .	34
Figura 17. Southern de las transformantes de <i>Trichoderma harzianum</i> .	35
Tabla 1. Posición cromosómica de <i>prb1</i>	7
Tabla 2. Genes reporteros de mayor aplicación en el estudio de la regulación genética	9

RESUMEN

Las especies del género *Trichoderma* son hongos ascomicetos utilizados como agente de control biológico contra hongos patógenos de plantas. En *Trichoderma atroviride* la proteasa Prb1 participa en la lisis del hongo parasitado ya que su expresión se ve incrementada por la presencia de este o de las paredes celulares del mismo, la sobre expresión del gen *prb1* da una mayor capacidad biocontroladora contra hongos fitopatógenos. Con la finalidad de analizar la expresión del gen *prb1* en otras especies del género *Trichoderma* se generó un plásmido denominado pUE04, el cual contiene el gen reportero *gusA* fusionado a las regiones regulatorias de *prb1*. Se transformó a la especie *T. atroviride* con este plásmido por método de polietilenglicol- CaCl_2 para generar transformantes estables con un fenotipo similar a la cepa silvestre. Para esto se analizó su crecimiento en medios de cultivo sólidos y líquidos, así como su actividad micoparasítica. Por otro lado dos especies distintas de *Trichoderma harzianum*, T35 y YF fueron transformadas con el plásmido pUE04 por el método de biobalística generando transformantes las cuales permitirán el análisis de la expresión del gen *prb1* a través del ensayo correspondiente al gen reportero *gus*.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Hongos como agentes de control biológico.

La generación de métodos de biocontrol a partir de hongos filamentosos ha permitido el control de enfermedades en plantas sobre todo de aquellas de origen fúngico donde el control químico es poco eficiente. Para que se lleve a cabo el control biológico, el hongo debe interactuar con el fitopatógeno. Existen diversas formas en las que dos hongos pueden interactuar, desde la coexistencia armónica de las especies en un nicho común, hasta aquella en donde una especie sirve directamente como alimento para la otra, este último tipo de relación antagónica entre hongos está íntimamente ligada al biocontrol.

Las relaciones antagónicas entre hongos incluyen los siguientes fenómenos: antibiosis, competencia y parasitismo. Estos representan los mecanismos básicos por medio de los cuales opera un agente de biocontrol para el control de enfermedades en plantas (Chet, 1997; Screen y col., 1997).

La capacidad antagonista de un hongo está determinada parcialmente por su estado fisiológico, así que cambios en las condiciones nutricionales o ambientales afectarán el desarrollo de una interacción (Rayner y Webber, 1984).

La competencia entre hongos ocurre de manera natural en un fenómeno que se conoce como captura primaria de nutrientes, este fenómeno depende de la capacidad saprofítica del hongo, la cual está supeditada a las condiciones ambientales existentes. Muchos hongos fitopatógenos requieren nutrientes suficientes para llevar a cabo el proceso infectivo en las plantas (Baker y Griffin, 1995), así como la competencia por aquellos factores nutricionales primarios como son el carbono, nitrógeno y hierro. Sivan y Chet (1989) encontraron que la cepa *T. harzianum* T-35 era capaz de controlar a *Fusarium spp* a través de la competencia por nutrientes y la colonización de rizosferas a través de los nutrientes disponibles.

La competencia puede darse a un nivel más avanzado en un fenómeno conocido como captura secundaria de nutrientes donde un hongo que ha colonizado un sustrato es desplazado por la actividad antagónica de otro. El desplazamiento puede estar mediado por contacto (parasitismo, interferencia de hifas, etc.) o bien

independiente del mismo (producción de antibióticos, enzimas, toxinas, etc.). Estas estrategias no son las únicas, ya que pueden ocurrir una o varias actuando en secuencia o simultáneamente. Solo cuando un hongo obtiene los nutrientes directa o indirectamente de otro hongo puede ser denominado micoparasitismo, este fenómeno puede incluir cualquiera de las estrategias antes mencionadas.

1.2 Micoparasitismo

Se define como la relación de parasitismo de un hongo sobre otro, pertenece a las relaciones de tipo competitivo en el cual una de las 2 especies que participa es beneficiada, esto también se conoce como asociación micotrófica o hiperparasitismo.

Los micoparásitos se dividen en dos categorías con respecto a la forma de obtener los nutrientes. Los micoparásitos necrótroficos, primeramente matan al huésped y posteriormente aprovechan de este los elementos necesarios para sustentar su crecimiento, generalmente secretan toxinas y enzimas líticas al medio y carecen de estructuras diferenciadas de infección. La obtención de nutrientes se puede dar por dos tipos de interacción, en algunas interacciones el contacto de hifas permite la transferencia de nutrientes, este tipo de micoparásito es conocido como necrótrofos de contacto. Los que atraviesan el micelio y se llaman necrótrofos invasivos. Estos penetran las hifas de sus huéspedes ocasionando la degradación y muerte del citoplasma invadido (Jeffries y Young, 1994). Los micoparásitos biotróficos obtienen sus nutrientes directamente del micelio vivo del huésped, en estas relaciones biotróficas el huésped vivo soporta el crecimiento del parásito por un tiempo prolongado sin que existan signos de daño.

1.3 *Trichoderma* como un agente de control biológico

Algunas especies pertenecientes al genero *Trichoderma* han sido utilizadas como agentes de control biológico, *Trichoderma* se clasifica dentro de los hongos deuteromicetos o imperfectos. Muchas de sus especies han sido aisladas de suelos en zonas geográficas muy distintas y distantes lo cual demuestra su amplia distribución. El uso de ésta especie como agente biocontrolador fue propuesta inicialmente por Weindiing en 1932, pero Wells y col., en 1972 reportaron por primera vez el control de *Sclerotium rolfsii* por la aplicación de *Trichoderma* al suelo en condiciones naturales. La actividad antagónica de *Trichoderma* se ha demostrado *in vitro* con una gran variedad de hongos de las clases Oomycota, Ascomycota, Basidiomycota y deuteromycota. *T. harzianum* produce enzimas, proteasas, lipasas, quitinasa y β -1,3 glucanasas (Elad y col., 1982; Sivan y Chet 1989; Haran y col., 1996). La quitinasa tiene el papel más importante en los diversos procesos fisiológicos de los hongos tales como la diferenciación celular, germinación, crecimiento apical, ramificación de las hifas y apareamiento (Gooday, 1990; Kuranda y Robbins, 1991).

1.4 Mecanismos de la actividad antagónica de *Trichoderma*

Los principales mecanismos asociados al antagonismo de *Trichoderma* son: antibiosis (Ghisalberti y col. 1991; Schuller y col., 1994; Herrera-Estrella y Chet, 1998), competencia por nutrientes (Sivan y Chet, 1989) y micoparasitismo (Herrera-Estrella A. y Chet, 1998). Las etapas del micoparasitismo son: crecimiento quimiotrófico de *Trichoderma*, reconocimiento del huésped por el micoparásito, secreción de enzimas líticas, penetración de hifas y lisis del huésped (Herrera-Estrella A. y Chet, 1998).

Existe un gran número de evidencias que sitúan a la participación de enzimas líticas como importantes factores de patogenicidad en distintas relaciones parasíticas como son hongo-hongo (Haran, 1996), hongo-insecto (Clarkson y Charnley, 1996), hongo-planta (Idnurm y Howlett, 2001), entre otros. Cuando se analizan actividades hidrolíticas extracelulares de un parásito o patógeno, bajo condiciones que simulan

una interacción con su huésped, existe una relación directa entre las actividades líticas producidas por el parásito y la presencia de sus sustratos como los principales componentes estructurales del huésped (Clarkson y Charnley, 1996; Haran col., 1996).

1.5 Actividades enzimáticas asociadas al micoparasitismo en *Trichoderma*

Se ha podido evidenciar la penetración y destrucción de las hifas de *R. solani* por *T. harzianum* (Elad y col., 1983), lo cual ocurre con mayor o menor frecuencia dependiendo de la especie de *Trichoderma* que se trate. *T. harzianum* es capaz de producir un complejo de enzimas hidrolíticas en presencia de paredes celulares de *R. solani* (Ridout y col., 1986).

La importancia de las enzimas hidrolíticas en el micoparasitismo ha sido evidente mediante la interrupción y/o sobreexpresión de esos genes, observándose un efecto directo en la capacidad antagónica de *Trichoderma*. La producción de proteasas, quitinasas y β -1,3, glucanasas inducidas por paredes celulares o por micelio completo de hongos huéspedes ha sido descrita para varias especies del género *Trichoderma*. Al parecer la acción coordinada de todas estas enzimas provoca la lisis del huésped convirtiéndolo en una fuente de nutrientes (Elad y col., 1982; Ridout y col., 1988; Geremia y col., 1993). El sistema quitinolítico de *T. harzianum* comprende β -1,4 glucosaminidasa y endoquinasa (Haran et al; 1995). Se conocen diversos genes que codifican enzimas asociadas al micoparasitismo como son: *chit33* (Limon y col., 1995), *ech42* (Carsolio y col., 1994; Hayes y col., 1994), *nag1* (Peterbauer y col., 1996), *prb1* (Flores y col., 1997), hay nuevos genes de enzimas entre otros. La expresión de estos genes se induce por la presencia de un huésped o en condiciones que simulan el micoparasitismo, siendo necesaria una limitación nutricional para estas respuestas.

1.6 El papel de *prb1* en el micoparasitismo de *Trichoderma*

El gen *prb1* codifica para una proteína básica de 31 kDa. La actividad de Prb1 en conjunto con la de otras enzimas líticas son eventos fundamentales para el proceso micoparasítico. Cepas transgénicas de *Trichoderma* sobreexpresantes de *prb1* mostraron un nivel superior de control con respecto la cepa silvestre de la enfermedad causada por *R. solani* en plantas de algodón (Flores et al 1997), sugiriendo que la expresión de este gen está directamente involucrada en el proceso micoparasítico de *Trichoderma*.

El gen *prb1* codifica para una proteasa básica de 31 kDa. Este gen se expresa a altos niveles por la presencia de un huésped o quitina, ya sea en cultivos líquidos o sólidos. Su expresión se favorece por limitación nutricional, es decir la carencia en las fuentes de carbono o nitrógeno permiten la expresión de *prb1* en presencia del huésped. Condiciones de estrés como altas y bajas de temperaturas también son factores que inducen a *prb1*.

En ensayos de confrontación en los cuales *Trichoderma* tiene contacto con el hospedero (directa), así como en los cuales no tiene contacto con él (indirecta), se ha observado que *prb1* es inducido, por lo cual se sabe que no se necesita un contacto físico entre *Trichoderma* y el hospedero para la inducción de este gen (Cortes y col., 1998).

Se tiene conocimiento de la diversidad genética que existe en el género de *Trichoderma* por medio de un análisis realizado a diversos aislados de *Trichoderma* (Figura 1) el cual también mostró que el gen *prb1* se encontraba localizado en diferentes posiciones cromosómicas, siendo identificado este gen en diferentes especies del género *Trichoderma* (Gómez y col., 1997) (Tabla1),

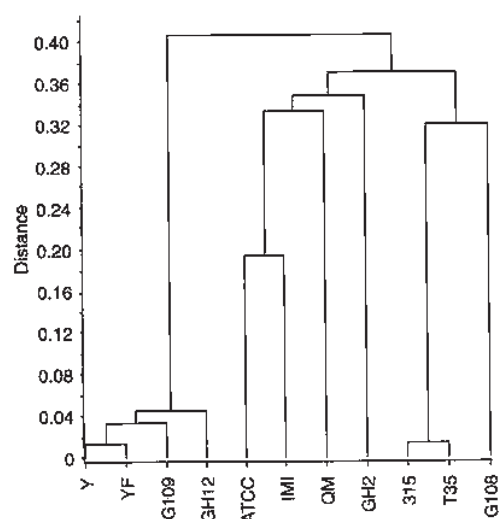


Figura 1. Diversidad genética de diversos aislados de *Trichoderma*.

Tabla 1. Posición cromosómica de *prb1*

CEPAS	Cromosoma
<i>T. harzianum</i> YF	I
<i>T. harzianum</i> T35	V
<i>T. atroviride</i>	V-VI

1.7 Elementos regulatorios del promotor *prb1* de *Trichoderma atroviride*

prb1 es un gen inducible por el hospedero o por condiciones de estrés, además de estar sujeto a represión catabólica, por lo que es importante mencionar los elementos reguladores presentes en su promotor. El promotor de *prb1* en *Trichoderma atroviride* presenta un elemento de respuesta a estrés (STRE) (Marchel y col., 1993), una caja GC también conocida como CreA de represión por glucosa (Trumbly 1992), 5 cajas HGATAR (Marzluf 1997, Screen 1998) involucradas en la represión de ciertos genes que participan en la asimilación de fuentes de

nitrógeno y 4 presuntos elementos de respuesta a micoparasitismo (MYRE) (Cortés y col., 1998; Olmedo-Monfil y col., 2002) (Figura 2). Estos elementos MYRE se encuentran localizados en las regiones promotoras de los genes *prb1* y *ech42* (Cortés y col., 1998).

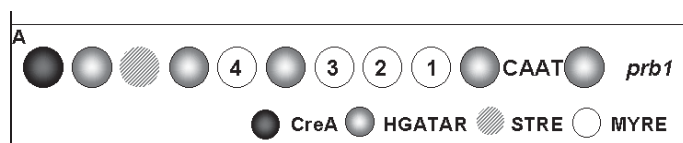


Figura 2. Promotor del gen *prb1*. Representación esquemática de los elementos de respuesta presentes en el gen *prb1*.

Se han realizado estudios para analizar la expresión del *prb1* transformando a *T. atroviride* con plásmidos que contenían el gen *gfp* fusionado a diferentes versiones del promotor *prb1* conteniendo algunas de sus regiones regulatorias. Las transformantes generadas con estas versiones fueron analizadas en su respuesta micoparasítica así como en su respuesta a la represión catabólica por N, demostrando la participación de algunos de los elementos de respuesta presentes en el promotor *prb1* (Olmedo-Monfil y col., 2002).

1.8 Genes reporteros para el análisis de expresión de promotores

Los genes utilizados como reporteros (Tabla 2) codifican para proteínas cuya presencia es medible, lo que nos permite analizar y cuantificar de manera indirecta la expresión de genes cuando sus promotores son fusionados a estos. Genes reporteros pueden codificar enzimas que tienen un ensayo simple de actividad necesaria para medir la transcripción de un gen de interés. El gen reportero fusionado a un promotor ayudará a determinar los componentes de regulación transcripcional de un gen determinado.

Tabla 2. Genes reporteros de mayor aplicación en el estudio de la regulación genética.

Genes	Origen	Función
cat (acetiltransferasa del cloranfenicol)	<i>E. coli</i>	Transfiere grupos radiactivos del acetilo al cloranfenicol; detección por la cromatografía y la autoradiografía de capa delgada
lacZ (β -galactosidasa)	<i>E. coli</i>	Hidroliza galactósidos incoloros para rendir productos coloreados.
gus (β -glucuronidasa)	<i>E. coli</i>	Hidroliza glucurónidos incoloros para rendir productos coloreados
luc (luciferasa)	Luciernaga	Oxida la luciferina, emitiendo los fotones.
gfp (proteína fluorescente verde)	Medusa	Despide luz fluorescente en la irradiación con UV

Referencia: www.opbs.okstate.edu/~melcher/mg/mgw4/mg429.html

El gen *gusA* de *E. coli* codifica la enzima β -glucoronidasa (GUS), esta enzima puede hidrolizar el cromógeno (generador de color) X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónido) resultando en la producción de un color azul insoluble evidenciando la actividad de GUS en función de la actividad del promotor estudiado. El ensayo GUS es fácil de realizar, sensible, alta confiabilidad, seguro, no requiere de equipo especializado y es totalmente visual (Jefferson 1987; Jefferson y col., 1987; Jefferson y Wilson 1991). Tiene una expresión estable, no interfiere con el metabolismo normal del organismo estudiado y es capaz de tolerar fusiones en su N-terminal.

El gen reportero *gusA* ha sido utilizado exitosamente en *Trichoderma virens*. La fusión transcripcional de este reportero al promotor *alcA* que se transactiva por la

proteína *alcR* inducida por la presencia de etanol como fuente de carbono permitió evidenciar la utilidad de este reportero en *Trichoderma* (Figura 3).



A



B

Figura 3. Detección de la actividad de GUS en una cepa transformante de *T. virens* con la construcción *alcA-gusA*. **A)** Transformante crecida en medio Vogel. **B)** Transformante crecido en medio Vogel con etanol.

2. JUSTIFICACIÓN

En *T. atroviride* IMI 206040 la expresión de la proteasa básica Prb1 está íntimamente ligada con su actividad parásita. Su inducción esta determinada por diferentes factores entre los que se encuentra la limitación en la fuente de carbono y nitrógeno así como la presencia de un huésped o pared celular del mismo.

Homólogos al gen *prb1* han sido clonados y/o identificados en otras especies del género, sin embargo no se conoce la forma en que estos son regulados. Así, se hace necesario generar las herramientas moleculares que nos permitan estudiar los elementos y mecanismos regulatorios asociados a la expresión del gen *prb1* en las diferentes especies del género.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

- Generar cepas transformantes de *Trichoderma* que permita el análisis heterólogo-funcional de la región promotora del gen *prb1* de *T. atroviride*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir un vector utilizando el gen reportero *gusA* para el análisis de expresión del promotor *prb1*.
- Generar transformantes de *T. atroviride* y *T. harzianum* (cepas T35 y YF) con el vector que contiene las regiones regulatorias del gen *prb1* fusionadas al gen reportero *gusA*.
- Analizar y seleccionar las transformantes generadas que presentan un fenotipo similar a la silvestre.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Microorganismos

Se utilizaron las siguientes cepas:

- *T. atroviride* (IMI206040)
- *T. harzianum* (T35 y YF)
- *Rhizoctonia solani* AG4
- *E.coli* TOP10F' (INVITROGEN), se utilizó para la propagación de plásmidos.

4.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Medios de crecimiento

- Papa Dextrosa Agar (**PDA**)(Almidón de patata, Dextrosa, Agar)-DIFCO
- Papa Dextrosa Caldo (**PDB**)(Almidón de patata, Dextrosa)-DIFCO
- Medio Mínimo completo (**MM**). Este medio contiene $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g), K_2HPO_4 (0.9 g), KCL (0.2 g), NH_4NO_3 (1g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (2.0 mg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (2.0 mg), $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2.0 mg) y 20 g Glucosa para preparar 1L. El pH se ajustó a 5.5. El medio se prepara a partir de un Stock 100X sin K_2HPO_4 y $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.
- Medio completo de Luria-Bertani (**LB**) Medio de cultivo compuesto de 10g de Bacto – Triptona, 5g de Extracto de levadura y 10 g de NaCl para 1 litro de agua destilada. Para selección de transformantes se utilizo carbenicilina y cloranfenicol a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y 25 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

4.3 Plásmidos

- **p4** (Figura 2)
- **p4-gusA** (Figura 3)
- **pCB- 1004** (Figura 4)

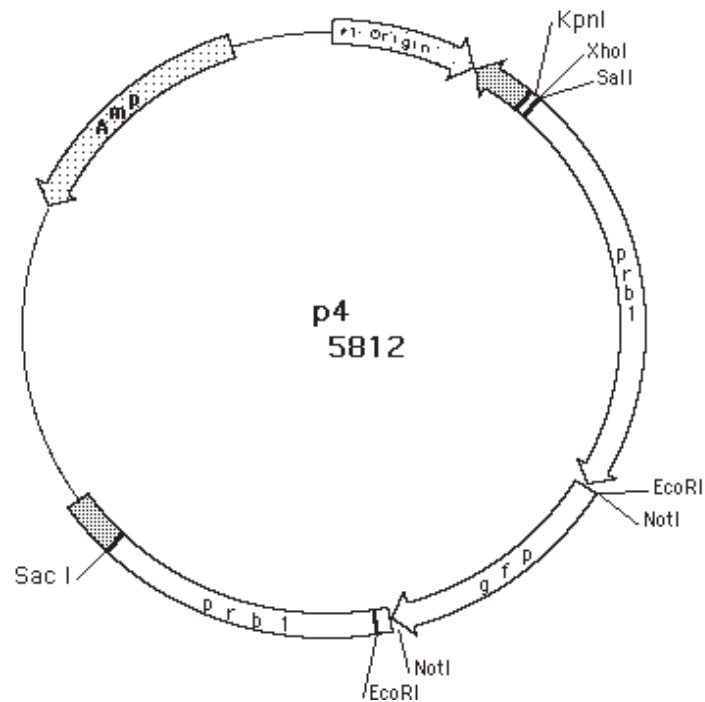


Figura 4. Mapa de el plásmido p4 (Olmedo-Monfil y col., 2002). Este plásmido es derivado de pBluescript el cual contiene las regiones regulatorias del gen *prb1* (promotor y terminador) fusionados al gen reportero *gfp*, AMP el gen que le da resistencia a ampicilina.

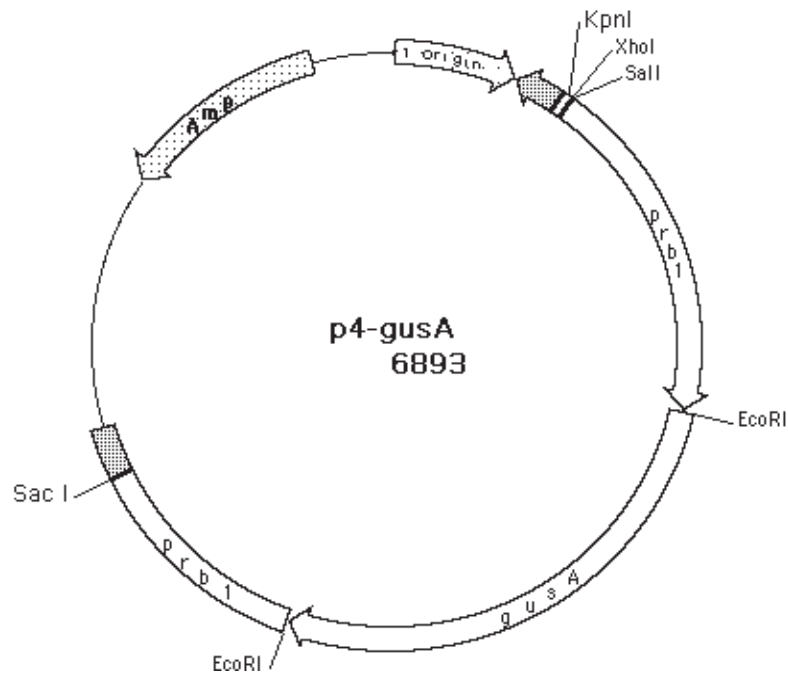


Figura 5. Mapa de el plásmido p4-gusA. Este plásmido es derivado de p4 y contiene el gen reportero *gusA* fusionado a las regiones regulatorias del gen *prb1* (promotor y terminador), AMP es el gen que le da resistencia a ampicilina. La orientación correcta de *gusA* bajo el control del promotor *prb1* se determinó por PCR y por secuenciación.

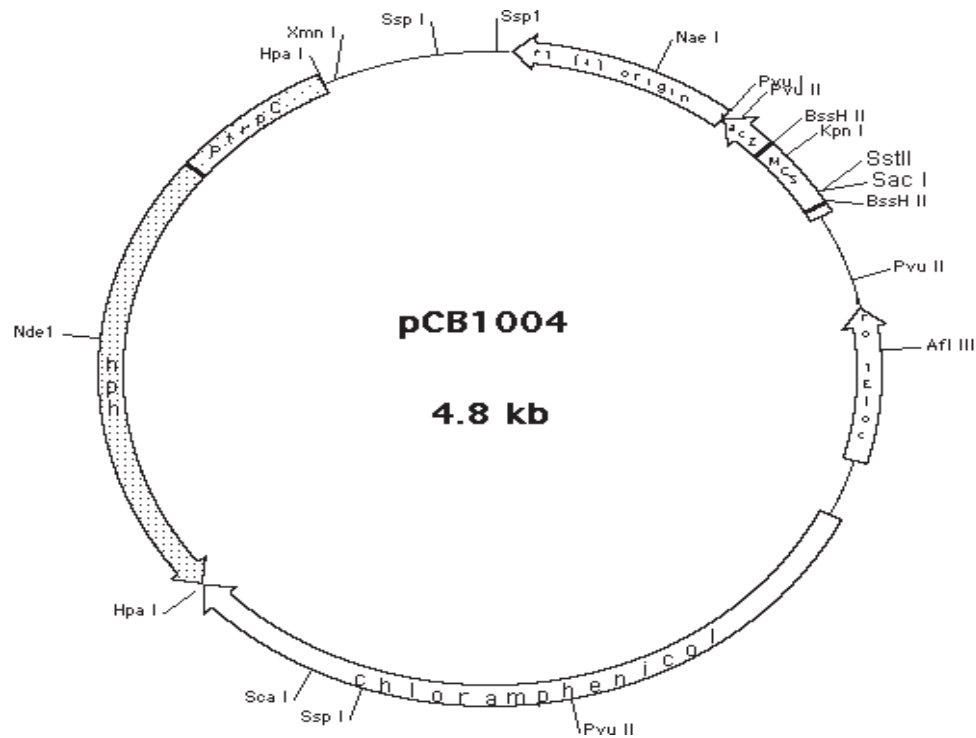


Figura 6. Mapa del plásmido pCB1004 (Fungal Genetics Stock Center). Este plásmido contiene el gen *hph* que codifica para la higromicina fosfotransferasa, Chloramphenicol este gen le da resistencia a cloranfenicol, un ORIGEN COLE 1 es el origen de replicación para *E.coli*, MCS es el sitio de múltiple clonación, Lac Z gen de la β -galactosidasa.

4.4 Condiciones de crecimiento.

4.4.1 Cultivo líquido. Los matraces con medio líquido (PDB) se inocularon con 1×10^6 esporas/ml, incubándose a 28°C durante 48h con agitación orbital constante a 180 rpm.

4.4.2 Cultivo en medio sólido. Cajas de Petri con medios sólidos se inocularon con las esporas de los aislados de *Trichoderma* mencionados en el apartado, incubándose a 28°C durante 6-10 días. Para aislar colonias se agregó al medio antes de esterilizar Triton X-100 a una concentración final de 0.5%

4.5 Recolección de esporas a partir de medios sólidos.

Se adicionan de 2-3 ml de agua destilada estéril a cada caja con esporas. Las esporas se removieron de la superficie haciendo pasar suavemente una espátula de vidrio previamente esterilizada. Con la pipeta se colectaron las esporas y se colocaron en tubos cónicos estériles de 15 ml.

4.6 Aislamiento de DNA a partir del gel de agarosa

El DNA se separo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y una vez identificado el fragmento deseado se corto el pedazo de gel que lo contenía con un bisturí. El aislamiento del DNA se realizó según las especificaciones del proveedor de QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN).

4.7 Método Birboin para Minipreparación de DNA de plásmido (MP)

A partir de un cultivo bacteriano (*E. coli*) crecido durante 14 h se transfirieron 1.5 ml a un microtubo y se centrifugaron 20 seg. a 12000 rpm. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 200 μ l de solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM) manteniendo la muestra en hielo. Se adicionaron 400 μ l de la solución II, preparada en el momento (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezcló por inversión. La muestra se incubó 5 min en hielo y se adicionaron 300 μ l de la solución III (Acetato de potasio 26.62 g, Ácido acético glacial 11.5 ml, agua destilada estéril para preparar 100ml ajustar pH 4.8) y 5 μ l de RNasa (1 μ g/ μ l). Se mezcló en

vortex y posteriormente se incubó durante 15 min en hielo y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min para eliminar restos celulares y DNA cromosómico. Se rescató el sobrenadante y se le adicionó un volumen igual de isopropanol. La muestra se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante 15 min. Se centrifugó 15 min a 12000 rpm para precipitar DNA plasmídico. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl etanol al 70% para eliminar sales. Finalmente se centrifugó 10 min a 12000 rpm y se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con agua destilada estéril.

4.8 Purificación de plásmido mediante columna de QIAGEN

El DNA de alta pureza se obtuvo pasando el DNA obtenido a través de columnas QIAGEN Plasmid Midi Kit (100) de acuerdo a las instrucciones del proveedor (QIAGEN).

4.9 Extracción de DNA genómico

La muestra de micelio previamente congelada se molió en un mortero con nitrógeno liquidó. El polvo resultante se transfirió a un microtubo de 2.5 ml y se le adicionaron 600 µl de buffer urea [Urea 7M, NaCl 0.35M, EDTA 0.02M, Tris HCL 0.05M (pH 8), Sarcosina (N-Lauril-Sarcosina) 1%]. Se mezcló en vortex durante 2 min y se incubó a temperatura ambiente durante 30 seg. Posteriormente se le adicionaron 300 µl de Fenol y 300 µl de Cloroformo y se agitó en vortex durante 10 min. La muestra se centrifugó 15 min a 10000 rpm y el sobrenadante se recuperó y se le adicionaron 300 µl de Fenol y 300 µl de Cloroformo a la muestra y se repitió el proceso anteriormente descrito, se mezcló en vortex 10 min. y se centrifugó 15 min. a 10000 rpm. Al sobrenadante recuperado se le adicionó 1 volumen de isopropanol o dos de etanol absoluto, 1/10 de Acetato de sodio concentrado 3M y se mezcló por inversión. La hebra formada (DNA) se retiró con una varilla de vidrio y se lavó con Etanol 70 %. El DNA se resuspendió en un volumen 50 µl de agua destilada estéril adicionando 3 µl de RNasa (1µg/µl) y finalmente se dializó utilizando una membrana millipore durante 20 ó 30 min en agua desionizada estéril.

4.10 Análisis Southern-Blot

De la cepa silvestre así como sus transformantes, se digirieron 8 μg de DNA con la enzima de restricción *EcoRI* a 37°C durante 8 h. Los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. Posteriormente el gel se trató por 10 min con solución de depurinación (HCl 0.125 M), durante 30 min con la solución de desnaturalización (NaOH 0.5 N, NaCl 1M). El gel fue colocado en un sistema de transferencia por capilaridad toda la noche, utilizando para la transferencia del DNA a las membranas de nylon la solución desnaturalizante (Figura 7) (Amersham Hybond-N+, Membrane optimized for nucleic acid transfer) (BIOSCIENCES)

Finalmente la membrana se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se fijó en un entrecruzador (UV stratalinker 2400) (STRATAGENE). Las membranas se hibridaron con fragmentos marcados con *gusA* radioactivamente con fósforo 32 (^{32}P).

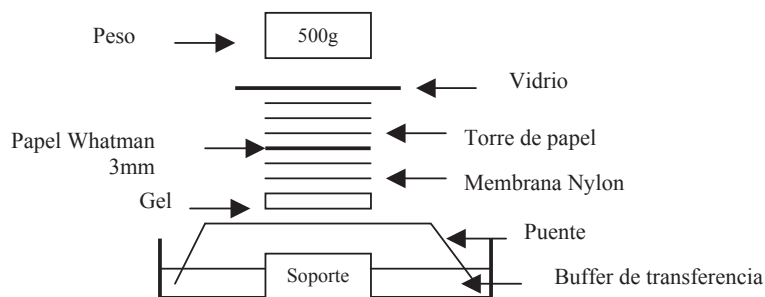


Figura 7. Representación del sistema de transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nylon.

4.11 Transformación de las células competentes de *E.coli* mediante electroporación.

La preparación de células electrocompetentes de la cepa TOP10F' (INVITROGEN) de *E. coli* se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el manual de PLASMID TOPO TA CLONIN KIT VERSIÓN C (INVITROGEN). La mezcla de transformación se colocó en una celda de electroporación y se le aplicó una corriente de 200 volts a las células durante 1.4 milisegundos, en un eletroporador (CELL-PORATOR Electroporation System) (GIBCO). Las células se transfirieron a un tubo conteniendo 1 ml de medio LB y se incubaron 1 h a 37°C con agitación constante en un agitador orbital. Inmediatamente después se extendieron sobre una caja Petri con medio sólido LB carbenicilina o cloranfenicol dependiendo del marcador de selección del plásmido y se incubaron durante 12 h a 37°C para seleccionar las células transformantes resistentes.

4.12 Electroforesis.

Para realizar el análisis de la calidad de el DNA extraído, separar fragmentos y verificar las restricciones realizadas, el DNA se corre en geles de agarosa al 1%(Sambrook, y col 1989), disueltas en un amortiguador TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 5 mM, pH 8) con bromuro de etidio (1µg por cada 2ml de agarosa). El DNA se mezcló con 1/6 de volumen de buffer de carga y se coloca en los pocillos del gel. Los geles se colocaron en cámaras que contenían TAE 1X (GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus), sometiéndolas a un voltaje constante de 75 voltios. El DNA se observa utilizando un transluminador de luz UV (BIO-RAD UV Transilluminator 2000).

4.13 Transformación de *T. harzianum* por el método de Biobalística.

4.13.1 Preparación de las partículas de tungsteno

Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno GE de M-5 y se colocaron en un tubo de 15 ml en donde se le adicionaron 2ml de HNO₃ 0.1 M; se incubaron en hielo durante 20 min y se centrifugaron de 10 a 30 seg a 10000 rpm; se desechó el HNO₃ y se le agregó 1 ml de agua desionizada estéril para trasferirla a un tubo con un volumen de 2 ml, en el cual se resuspendió por sonicación; se centrifugo por 10 – 30 seg a 10000 rpm para precipitar las micropartículas y así poder extraer el exceso de agua. A las micropartículas se les adicionó 1 ml de etanol 100 % y se les resuspendió nuevamente por sonicación, se centrifugaron de 10 a 30 seg a 10000 rpm para quitar el etanol, a las micropartículas se les agregó 1 ml de agua desionizada estéril y se les resuspendió por sonicación para tomar 200 µl de la suspensión y pasarla a tubos eppendorf a los cuales se les adicionaron 750 µl de agua desionizada estéril, conservandolos a -20°C.

4.13.2 Precipitación del DNA.

Se utilizó el método descrito por Sanford y colaboradores (1987). En un microtubo se adicionaron uno a uno los componentes primero se adicionó y se agitaron bien las suspensiones entre las adiciones: se adicionaron 5 µl de DNA 1mg/ml, 50 µl de la suspensión de micropartículas de tungsteno, 50 µl de cloruro de calcio 2.5 M, 20 µl de espermidina 0.1 M, se centrifugaron durante un lapso de 5-10 seg, y se desechó el sobrenadante. Se le adicionaron 140 µl de etanol absoluto ayudando a la resuspensión de las micropartículas con la punta de la micropipeta. Las micropartículas se centrifugaron durante un lapso de 5-10 seg extrayendo el sobrenadante con la micropipeta y posteriormente se adicionaron 50 µl de etanol absoluto resuspendiendo con la micropipeta y se sonicaron durante 2-3 segundos 2 veces. Se aplicaron de 5-6 µl de la suspensión de las micropartículas a cada disco acarreador de kaptón y se secaron a la temperatura ambiente antes de cerrar el desecador.

4.13.3 Transformación por biobalística

Se plaquearon 1×10^8 esp/ml de las cepas de *T35* y *YF* en cajas de Petri que contenían medio PDA, 0.4 M sorbitol. Las placas se dejaron secar 4 horas en una campana de flujo laminar. Después de este tiempo las esporas fueron bombardeadas con micropartículas de tungsteno recubiertas del plásmido pUE04.

Los disparos fueron realizados con una pistola de helio a 900 psi, a una distancia de 6cm (Figura 8).

4.13.4 Selección de transformantes.

Las placas con las esporas transformadas se incubaron a 28°C durante 7 h, después se les agregó 10 ml de medio PDB, agar 0.7%, higromicina 900 µg/ml para *YF* y para *T35* 600 µg higromicina por ml. Se incubaron a 28°C entre 3 y 5 días hasta la aparición de transformantes resistentes al antibiótico. Se seleccionaron colonias aisladas las cuales fueron sujetas a tres pases monospóricos, utilizando PDA, 0.5% Triton X-100 y higromicina 300 µg/ml para *YF* y higromicina 100 µg/ml para *T35*.

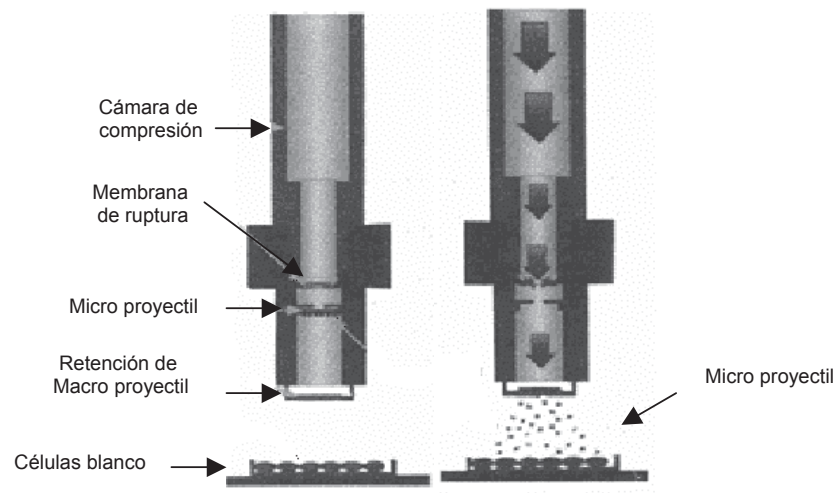


Figura 8. Pistola de alta presión utilizada en biobalística.

4.14 Transformación de *T. atroviride* por el método de polietilenglicol- CaCl_2 .

4.14.1 Preparación de protoplastos.

Se inocularon 500 μl de suspensión de esporas en 100 ml de medio GYEC (1.5 % de glucosa, 0.3 % de extracto de levadura y 0.5 % de caseína hidrolizada), incubándose por 24 horas. El micelio se colectó por centrifugación a 4000 rpm. por 10 minutos. Se lavó 2 veces con agua estéril. Se pesaron 0.5 g de micelio húmedo al cual se le agregaron 5 ml de solución osmótica (CaCl_2 50 mM, Manitol 0.5 M y MES de 50 mM, ajustado a pH 5.5 con KOH), con 6mg/ml de Novozyma previamente esterilizada por filtración. La mezcla se hizo en un tubo cónico de 15 ml. Se mantuvo en agitación a 120 rpm. a temperatura ambiente por 120 minutos y los protoplastos se filtraron usando 2 capas de filtro Miracloth; se lavaron con 2 ml de solución osmótica (CaCl_2 50mM, Manitol 0.5M, MES 50Mm pH 5.5 con KOH). Se colectaron por centrifugación a 8500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron cuidadosamente en un volumen entre 0.5 – 1.0 ml con solución osmótica. Los protoplastos se contaron utilizando un hematocitómetro, ajustando la concentración a $10^7 - 10^8$ / ml.

4.14.2 Transformación por el método de polietilenglicol- CaCl_2 .

El DNA se agregó a los protoplastos en las siguientes cantidades: 240 μl protoplastos + 20 μl de DNA del vector pUE04 (500 ng/ μl). Como control negativo a los protoplastos se les agregó 60 μl de solución osmótica. Se incubaron en hielo 20 minutos, al término de los cuales se agregaron 260 μl de solución de Polietilenglicol (40 % PEG 8 000 en solución osmótica), pre-calentada a 45°C y se mezcló suavemente. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se distribuyeron en placas de regeneración (1M de sacarosa e higromicina a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y PDA), a cada una se le agregó 25, 100 y 400 μl de la mezcla más 10 ml de TOP AGAR a 45°C. Posteriormente se incubaron a 28°C de 2 a 3 días.

4.14.3 Selección de transformantes

Colonias transformantes resistentes a higromicina de las placas de regeneración se aislaron pasándolas a PDA para promover la esporulación. Se incubaron a 28 °C hasta observar esporas las cuales fueron cosechadas en agua destilada estéril y cuantificadas. Las esporas de cada transformante fueron transferidas a medio de selección (Tritón X-100 0.5 %, higromicina 100 µg/µl y medio PDA-agar), incubadas a 28 °C hasta la emergencia de nuevas colonias, considerando hasta este punto la obtención de la primera generación. El proceso fue repetido hasta la obtención de la 4 generación de cultivos monospóricos.

4.15 Ensayo de confrontación *in vitro* con *R. solani*

Las confrontación es entre *T. harzianum* y *R. solani* se llevaron acabo en placas de MM sólido, adicionado de 0.2% de glucosa y cubiertas de la luz como fue descrito por Carsolio y colaboradores (1994) (Figura 9).

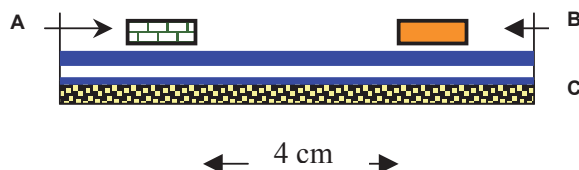


Figura 9. Ensayo de confrontación, (A) Bloque de micelio de *Trichoderma*, (B) Bloque de micelio de *R. solani*, (C) Medio mínimo (MM)

4.16 Determinación de peso seco

El micelio de cada una de las cepas, obtenido por crecimiento en el medio de cultivo papa dextrosa caldo (PDB) y medio mínimo (MM) durante 36 h a 28 °C, se colectó por filtración utilizando papel Whatman No. 3 previamente puesto a peso constante. Las muestras se colocaron en un horno a una temperatura de 80-90°C durante 24 h para eliminar la humedad, posteriormente se colocaron en un desecador hasta obtener pesos constantes y se determinó el peso seco de cada una de las muestras. El peso seco (crecimiento micelial) se determinó obteniendo la diferencia del peso seco de las muestras (papel whatman más micelio) y el peso seco del papel filtro.

5. RESULTADOS

5.1 Diseño de un plásmido para el análisis de expresión de *prb1*.

Para poder analizar la expresión de *prb1* en *T. atroviride* y *T. harzianum* se construyó un plásmido el cual contiene el gen reportero *gusA* fusionado a las regiones regulatorias de *prb1*. Para construir este vector se partió de 3 plásmidos (ver capítulo 4.3): p4, p4-*gusA* (que contienen las regiones regulatorias de *prb1*) y pCB1004 (este ultimo porta el marcador de selección a higromicina B), de los cuales se generó el plásmido pUE04 que contiene marcadores de selección para cloranfenicol (en bacterias) e higromicina (en hongos). El plásmido p4-*gusA* se obtuvo por el reemplazo del gen *gfp* por *gusA* del vector p4, utilizando el sitio de restricción *EcoRI*. Las regiones regulatorias del gen *prb1* fusionadas a *gusA* se obtuvieron del plásmido p4-*gusA* por digestión con las endonucleasas *SacI/KpnI* y se clonaron en el vector pCB1004, utilizando estos mismos sitios de restricción para obtener el plásmido pUE04 (Figura 11). La construcción correcta de este vector se corroboró a través del análisis de su patrón de restricción como se muestra en la figura 10.

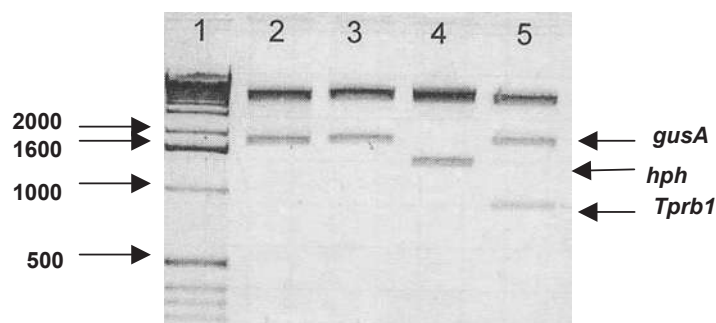


Figura 10. Patrón de restricción del plásmido pUE04. Carril 1 Marcador molecular de 1Kb, Carril 2 Restricción con la endonucleasa *BamHI* que libera *gusA*, Carril 3 Restricción con la endonucleasa *EcoRI* que libera *gusA*, Carril 4 Restricción con la endonucleasa *HpaI* que libera el gen *hph*, Carril 5 Restricción con las endonucleasas *SacI / EcoRI* que liberan *gusA* y el terminador *prb1*.

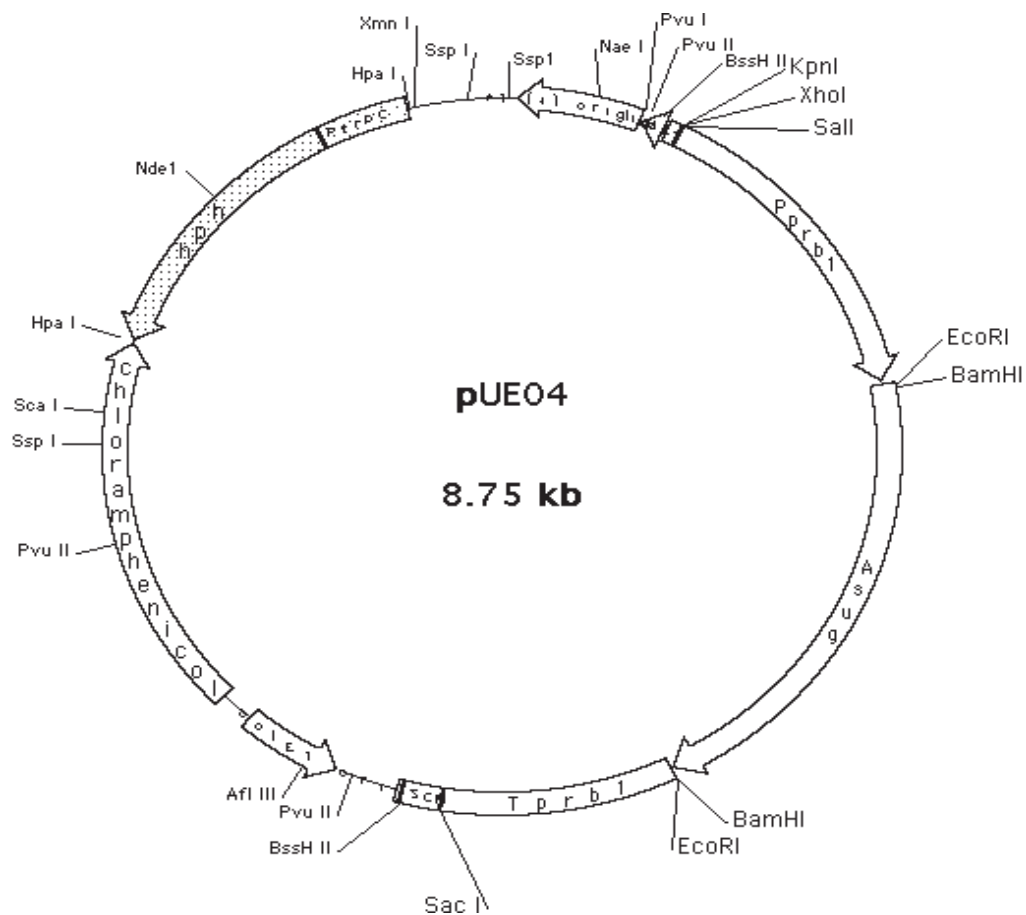


Figura 11. Mapa de el plásmido pUE04 construido a partir de pCB1004 en el cual se clonaron las regiones regulatorias *prb1* (promotor y terminador) fusionados a el gen reportero *gusA* en los sitios de restricción *Kpn1* / *Sac1*. Chloramphenicol este gen le da resistencia a cloranfenicol, ORIGEN COLE 1 es el origen de replicación para *E.coli*, MCS es el sitio de múltiple clonación, Lac Z gen de la β -galactosidasa, *hph* gen que codifica para la higromicina fosfotransferasa,

5.2 Obtención de Transformantes de *T. atroviride*

La cepa *T. atroviride* Se trasformó con el plásmido pUE04 por el método de polietilenglicol- CaCl_2 generándose transformantes resistentes a higromicina, las cuales fueron seleccionadas realizando tres pases monospóricos. Diferentes transformantes fueron crecidas en medio PDB y el micelio generado fue utilizado para la extracción de DNA genómico (materiales y métodos) y su análisis posterior por un ensayo de tipo Southern-blot.

El DNA genómico de las muestra fue digerido con la endonuclease *EcoRI* la cual nos libera al gen reportero *gusA* (1.8 kb). La presencia de este fragmento se identificó por hibridación utilizando a *gusA* como sonda y se observó que todas las transformantes contenían al gen *gusA* como se puede observar en la Figura 12.

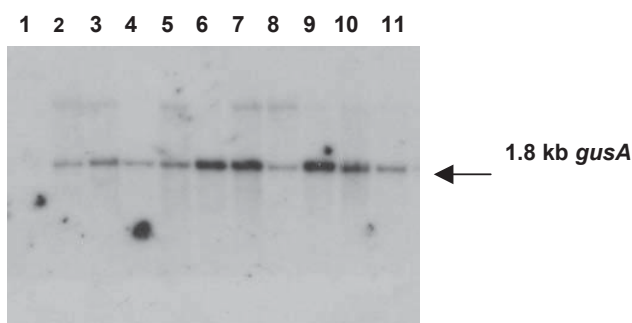


Figura 12. Análisis Southern-blot de transformantes de *T. atroviride*. Carril 1. Control negativo DNA de *IMI 206040* silvestre, Carriles 2-10. Transformantes de *T. atroviride*, Carril 11. Plásmido pUE04.

5.3 Análisis fenotípico de las transformantes.

Para determinar el efecto de la integración genómica del plásmido pUE04 sobre el crecimiento de *Trichoderma*, se analizó la cantidad de biomasa producida por cada una de las transformantes obtenidas. Las variaciones del peso seco obtenido con respecto a la cepa silvestre de *T. atroviride* en dos diferentes medios de cultivo: MM y PDB se muestra en las Figuras 13 y 14 respectivamente.

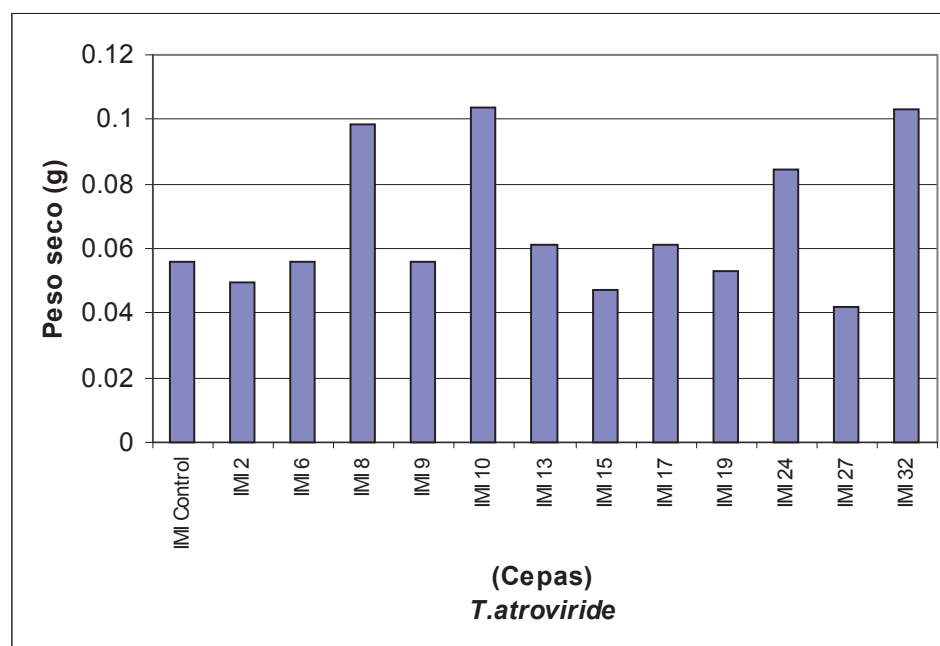


Figura 13. Análisis de biomazas en *T. atroviride* y sus transformantes. Peso seco de la biomasa obtenida de las distintas transformantes de *T. atroviride* crecidas en medio mínimo (MM).

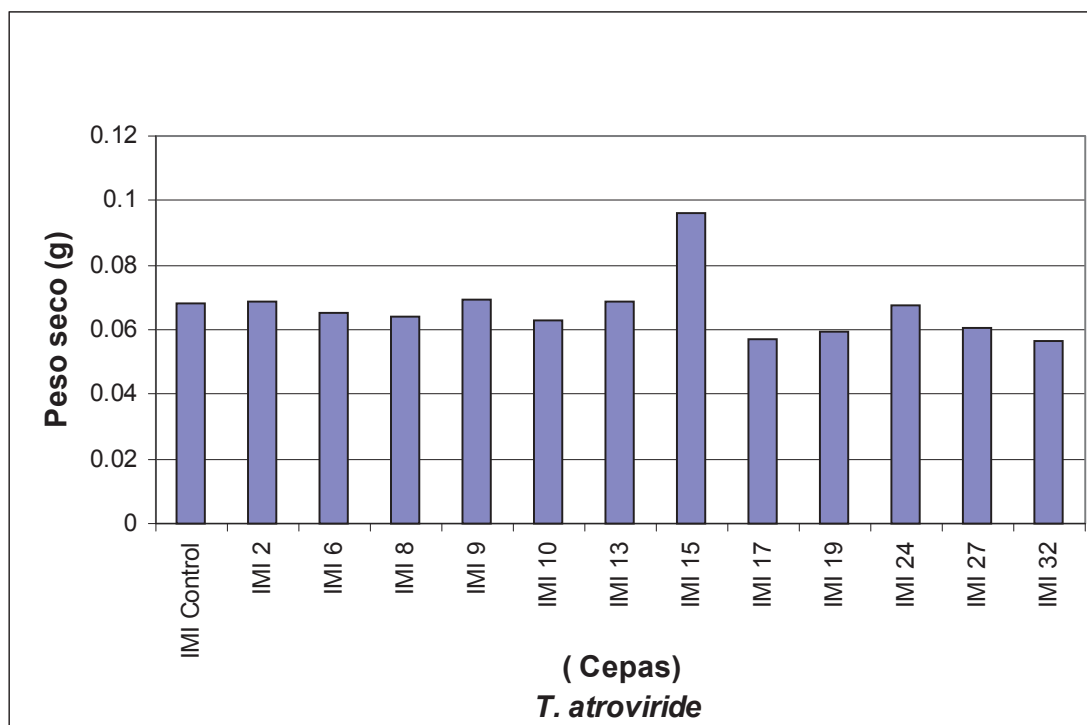


Figura 14. Análisis de biomasa en *T. atroviride* y sus transformantes. Peso seco de la biomasa obtenida de las distintas transformantes de *T. atroviride* crecidas en PDB.

Para el análisis de crecimiento radial, las transformantes fueron crecidas en medio PDA e incubadas a 28°C durante 6 días. El crecimiento diametral fue monitoreado diariamente y registrado fotográficamente. Algunas de las transformantes mostraron un crecimiento muy diferente al de cepa silvestre, esto es pérdida de un crecimiento radial o limitación del crecimiento apical (dato no mostrado). En la Figura 15 se muestra el crecimiento de aquellas transformantes que presentaron un patrón de crecimiento y esporulación similar al de la cepa silvestre.

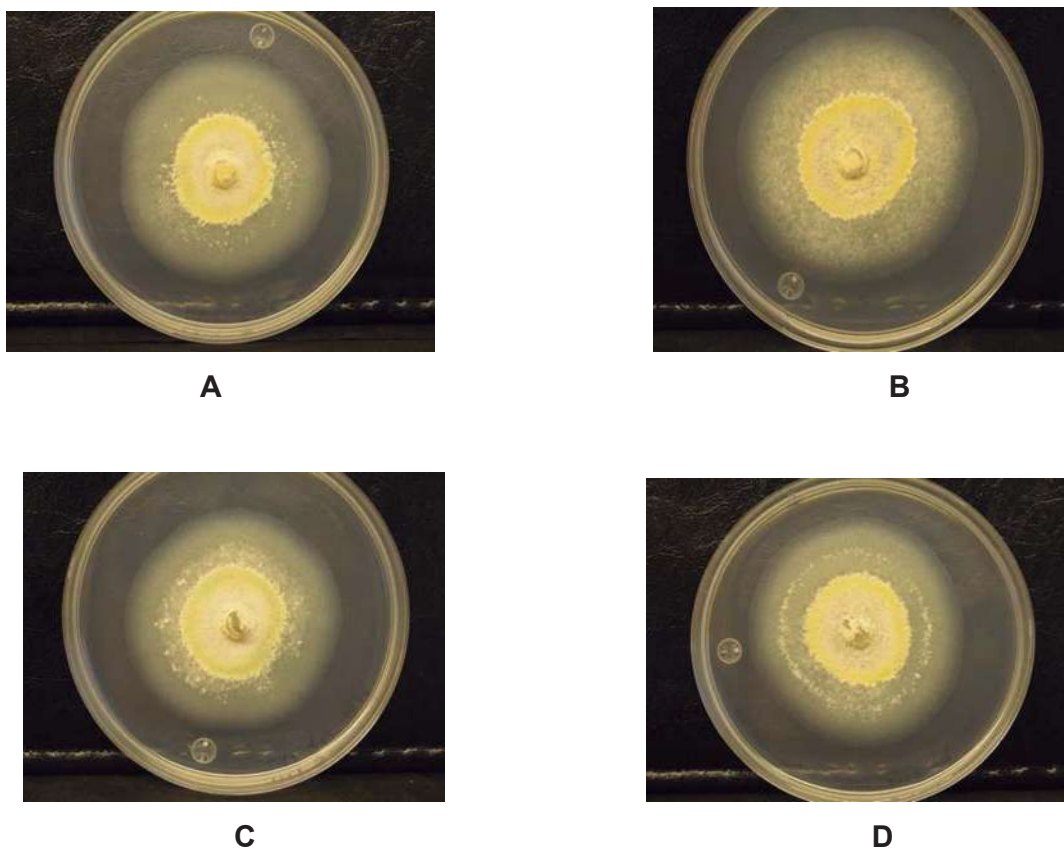


Figura 15. Evaluación del crecimiento radial en PDA de *Trichoderma atroviride*. A) *T. atroviride silvestre* B) *T. atroviride* 8 C) *T. atroviride* 6 D) *T. atroviride* 24

5.4 Análisis de micoparasitismo.

Una de las características deseables de las transformantes generadas es la permanencia de su capacidad micoparasítica. Así, las diferentes transformantes de *T. atroviride* fueron confrontadas *in vitro* con una cepa de *R. solani*. El ensayo fue llevado a cabo en MM hasta observar sobrecrecimiento de la cepa control. La comparación del crecimiento de las transformantes con el control permitió determinar que todas las transformantes inhibían el crecimiento de *R. solani*, aún cuando el crecimiento de estas fuera lento o irregular. Muchas de las transformantes presentaron deficiencia al esporular sobre *R. solani* (Figura 16).

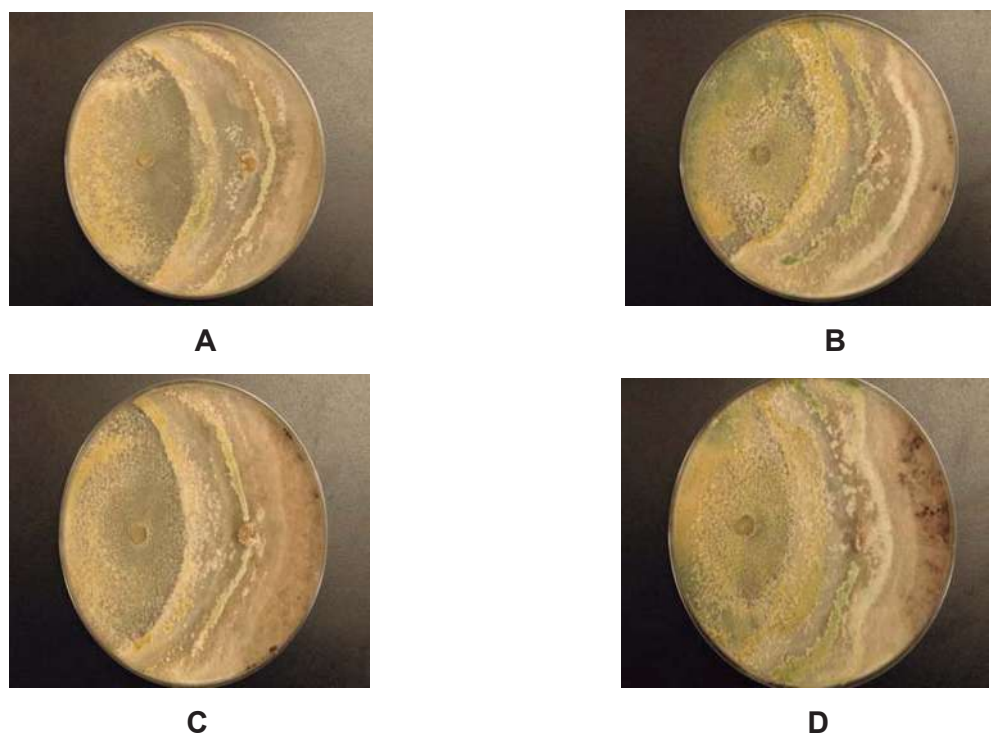


Figura 16. Evaluación de la actividad micoparasítica *in vitro* de *T. atroviride* vs *Rhizoctonia solani*. A) *T. atroviride* silvestre (derecha) vs *Rhizoctonia solani* (izquierda) B) *T. atroviride* 8 vs *Rhizoctonia solani* C) *T. atroviride* 6 vs *Rhizoctonia solani* D) *T. atroviride* 24 vs *Rhizoctonia solani*.

5.5 Transformación de *T. harzianum* (T-35 y YF) con el plásmido pUE04.

Antes de la transformación de las cepas de *T. harzianum* con el plásmido pUE04 se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria al antibiótico higromicina. Las cepas T35 y YF fueron crecidas en PDA adicionando con diferentes concentraciones de higromicina (100,200 y 300 $\mu\text{g/ml}$). *Trichoderma* T35 fue incapaz de crecer a la concentración más baja utilizada (100 $\mu\text{g/ml}$) mientras que la cepa YF fue inhibida a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina (dato no mostrado). Con estos antecedentes nos dispusimos a realizar la transformación de estas cepas con el plásmido pUE04 y asegurar el proceso de selección. El método de transformación de polietilenglicol- CaCl_2 , utilizado para *T. atroviride* fue aplicado para las cepas de *T. harzianum*, sin embargo en ningún caso logramos obtener los protoplastos resultado de la digestión con lisozima. Con esto se decidió utilizar el método de biobalística, mismo que había sido previamente utilizado con éxito en la transformación de *T. atroviride*. Aplicando este método se logro obtener transformantes las cuales fueron seleccionadas a las concentraciones de higromicina adecuadas para cada cepa. El éxito en la transformación se evidenció a través de un ensayo tipo Southern-blot utilizando *gusA* como sonda (Figura 17)

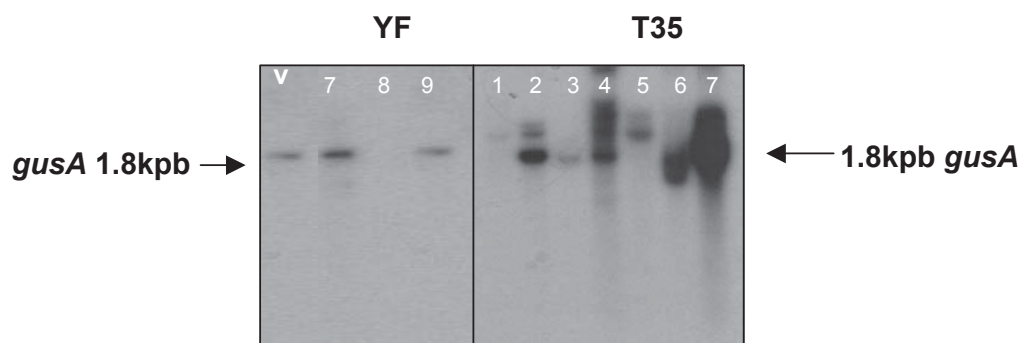


Figura 17. Southern de las transformantes de *Trichoderma harzianum* en el cual se observa la inserción del vector pUE04 (V) siendo digeridos por la endonucleasa *EcoRI*, *T. harzianum* YF carriles 7 y 9 transformantes que presentaron la inserción del vector, *T. harzianum* T35 carriles 2-4, 6,7 transformantes que presentaron la inserción del vector.

6. DISCUSSION

En diversos sistemas fúngicos se ha utilizado una gran variedad de genes reporteros para analizar la expresión de genes a través de la generación de fusiones traduccionales, mismos que han demostrado ser una herramienta molecular importante.

Estudios realizados para el análisis de la expresión del gen *prb1* de *T. atroviride* (Cortés et al, 1998) ha evidenciado que este se expresa en condiciones de micoparasitismo, limitación de nutrientes así como en presencia de paredes celulares de alguno de sus hongo huésped. Olmedo-Monfil y colaboradores (2002), utilizaron el gen reportero *gfp* para el análisis de aquellas regiones regulatorias identificadas en el promotor de *prb1*. Este trabajo permitió identificar mediante el monitoreo de la fluorescencia emitida por el reportero la participación de aquellas regiones asociadas con la respuesta micoparasítica (MYRE) así como aquellas implicadas en la represión catabólica por N. En este trabajo se presenta la generación de una fusión traduccional del promotor *prb1* con gen reportero *gus* que presenta ventajas sobre la utilización de *gfp*. Previo a este trabajo se había evidenciado la funcionalidad de GUS en una especie relacionada a *T. atroviride* (*T. virens*), lo que propicio la idea de utilizar la construcción utilizada por Olmedo-Monfil y colaboradores (2002) como base para la generación del vector pUE04. Este vector además de llevar las regiones para el estudio del promotor *prb1*, también lleva un marcador de selección para hongos, el gen *hph*, el cual confiere resistencia al antibiótico higromicina. Esta construcción nos permitió asegurar que la selección sobre la resistencia a higromicina consecuentemente condujera a la identificación de las transformantes para el estudio del gen *prb1*. La versión final del plásmido pUE04 fue verificada por un análisis de restricción utilizando las endonucleasas que liberaran todos los componentes de éste (Figura 10). La correcta identificación de la construcción fue requisito para continuar con la generación de las transformantes en las diferentes especies de *Trichoderma*. Inicialmente el proceso de transformación se hizo con la cepa de *T. atroviride*, la cual sería utilizada como control de regulación. Para este fin utilizamos el método de polietilenglicol-CaCl₂ (ver Materiales y Métodos), previamente establecido como método de transformación

estándar para *Trichoderma*. Las transformantes seleccionadas por su crecimiento en medios con higromicina fueron verificadas como positivas mediante un análisis tipo Southern-blot utilizando el gen completo *gusA* como sonda. La presencia del gen reportero *gusA* se observó en todas las transformantes analizadas, corroborando la utilidad de tener en un solo plásmido la región de interés junto con el marcador de selección. La inserción de nuevo material genético en *Trichoderma* puede generar cambios en su estado fisiológico y consecuentemente en su respuesta a diferentes condiciones de crecimiento. Por ello, se realizaron dos determinaciones asociadas al crecimiento, la primera de ellas se refiere a la cuantificación de la biomasa generada mediante la determinación de peso seco y la segunda el seguimiento del crecimiento radial-colonial. Estas determinaciones nos permitieron seleccionar las mutantes con mejor estabilidad y con un crecimiento similar a la cepa silvestre utilizada como control *T.atroviride*. En algunas de las transformantes obtenidas se observó un efecto severo sobre el crecimiento radial, esto es disminución del crecimiento apical en algunas zonas de la colonia (dato no mostrado).

La proteasa básica Prb1 es expresada a altos niveles en interacciones con un huésped. Así, otro de los aspectos importantes a evaluar en las transformantes generadas fue su capacidad micoparasítica. Con este fin llevamos a cabo ensayos de micoparasitismo *in vitro*, el cual consiste en colocar en una misma placa tanto al biocontrolador *Trichoderma* como a uno de sus huéspedes, *R. solani* en medio mínimo (MM). La prueba se considera positiva si existe sobrecrecimiento de *Trichoderma* sobre la colonia de *Rhizoctonia* después de un periodo definido de incubación, el cual este definido por el comportamiento de la cepa silvestre. Las transformantes seleccionadas para este análisis lograron sobrecrecer y consecuentemente inhibir el crecimiento de *R. solana* (Figura 16). Estos datos mostraron que el proceso de transformación e integración del plásmido pUE04 no afectó la capacidad micoparasítica.

Por otra parte y con el fin de generara las herramientas para el estudio de la expresión de *prb1* en una especie heteróloga, utilizamos el mismo vector pUE04 para la transformación de dos cepas de *T. harzianum* (T35 y YF). En un principio se intento transformar estas cepas por el método de polietilenglicol-CaCl₂,

encontrándonos con dificultades ya que la pared celular de estas cepas parecía insensible a la actividad de la lisozima, imprescindible para la generación de los protoplastos. Este resultado parece indicar una diferencia en composición y/o estructura entre estas cepas y la de *T. atroviride*. Un método alternativo, previamente utilizado en *Trichoderma*, es el de biobalística. La aplicación de este método permitió la generación de las transformantes de *T. harzianum* (YF y T35) con el vector pUE04. Las cepas seleccionadas como resistentes y presuntas transgénicas fueron analizadas mediante un ensayo de Southern-blot donde se verificó la inserción del vector. A diferencia con la transformación de *T. atroviride* por polietilenglicol, las transformantes de *T. harzianum* presentaron múltiples inserciones del vector, a saber por la señal obtenida en el ensayo de Southern-blot utilizando al gen *gusA* como sonda. Este resultado nos hace creer que la utilización del método de biobalística para transformar cepas inserta más de una copia del gen en la célula blanco.

Así, la generación de esta herramienta, cepas transgénicas con fusiones traduccionales de *gus* de los diversos aislados de *Trichoderma*, permitirá analizar la expresión de *prb1*, ya que se tiene conocimiento que en diversos aislados de *Trichoderma* el gen *prb1* se localiza en diferentes cromosomas. Esto hace interesante su estudio a fin de tener un mayor conocimiento de su expresión y las condiciones en las que sucede.

7. CONCLUSIÓN

- Se generó un vector denominado pUE04, el cual contiene el gen reportero *gusA* fusionado a las regiones regulatorias de *prb1*.
- Se logró transformar con éxito a *T. atroviride* y *T. harzianum* (T35 y YF) con el vector pUE04 obteniendo cepas transformantes de cada una de ellas.
- Se analizaron fenotípicamente las transformantes generadas de *T. atroviride* logrando obtener cepas estables similares a la cepa silvestre.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFIAS

1. Baker R. , and Griffin G. J. (1995). Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. In: Novel approaches to integrated pest management. Reuveni R (ed). Lewis, CRC Press, Boca Raton, p 369.
2. Carsolio C., Gutierrez A., Jimenez 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.
3. Chet I., Invar J., Hadar Y. (1997). Fungal antagonists and Mycoparasites. In Wicklow/Soderstrom (eds) The Mycota IV. Environmental and microbial relationships. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 165.
4. Clarkson J. M., Charnley A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol. **4**(5):197-203.
5. Cortés C., Gutierrez A., Olmedo V., Chet I., Herrera-Estrella A. (1998). The expresión of genes envolved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by diffusible factor. Mol Gen Genet **260**:218-225.
6. Dennis C., Webster J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. Trans Br Mycol Soc **57**:363-369.
7. Elad Y., Barak R., Chet I. (1983). Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma ssp.* and plant pathogenic fungi. Phytopathol Z **107**:168-175.
8. Flores A., Chet I, Herrera-Estrella A. (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma Harzianum* by overexpression of proteinase-encoding gene *prb1*. Curr Genet **31**:30-37.
9. Geremia 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.
10. Gómez I, Chet I, Herrera- Estrella A. (1997). Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates Mol Gen Genet **256**:127-135.

11. Gooday GW. (1990). Inhibition of chitin metabolism. In: Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. PJ Kuhn APJ Trinci, MJ Jung, MW Goosey and LG Copping (eds). Springer Verlag. Berlin, Germany. Pp 61-79.
12. Ghisalberti E. L., K. Sivasithamparam. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. **23**:1911-1020.
13. Haran S., Schickler H., Oppenheim A., Chet I. (1995). New components of the chitinolytics system of *Trichoderma harzianum*. Mycol Res **99**:441-446.
14. Haran S., Schickler H., Chet I. (1996). Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology **142**:2321-2331.
15. Hayes C.K., Klemsdal S., Lorito M., Di Pietro A., Peterbauer C., Nakas J. P., Tronsmo A., Harman G. (1994). Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. Gene **138**:143-148.
16. Herrera-Estrella A., Carsolio C. (1998). Medio ambiente, control biológico y hongos parásitos. Avances y Perspectiva., **17**: 195-204.
17. Herrera-Estrella A., and Chet I. (1998). Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. Agricultural Biotechnology (Colwell R. R., First N. L., Schell J., and Vasil I. K.) Marcel Dekker, Inc pp. 263-282.
18. Idnurm A., Howlett B. J. (2001). Characterization of an opsin gene from the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. Genome. **44**(2):167-71.
19. Jefferson R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology Reporter **5**: 387-405.
20. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., and Bevan M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal **6**: 3901-3907.
21. Jefferson R. A., and Wilson K. J. (1991). The GUS gene fusion system. In Gelvin, S. B. and R.A. Schilperoort (eds). Plants Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers (Dordrecht). **B14**: 1-33.
22. Jeffries P., and Young T. W. K. (1994). Interfungal parasitic relationships. International Mycological Institute and CAB International, Oxon.

23. Kuranda M. J., Robbins P. W. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**:19752-19767.
24. Limon M. C., Lora J. M., García I., De la Cruz J., Llobell A., Benitez T., Pintor-Toro J. A. (1995). Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **28**:478-483.
25. Marchel G., Schüller C., Adam G., Ruis H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae*, UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions *EMBO J.* **12**: 1997-2003.
26. Olmedo-Monfil V., Mendoza-Mendoza A., Gómez I., Cortés C., Herrera-Estrella A., (2002). Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*. *Mol. Genet Gen* **267**: 703-712.
27. Peterbauer C. K., Lorito M., Hayes C.K., Harman G. E., Kubicek C. P. (1996). Molecular cloning and expression of the *nag1* gene (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Curr Genet.* **30**(4): 325-31
28. Rayner A. D. M., and Webber J. F. (1984). Interspecific mycelial interactions – an overview. In: Jennings, DH and Rayner ADM (eds) *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 383-417.
29. Ridout C. J., Coley-Smith J. R., Lynch J. M. (1986). Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls or *Rhizoctonia solani*. *J Gen Microbiol* **132**:2345-2352.
30. Ridout C. J., Coley-Smith J. R., Lynch J. M. (1988). Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbial Rev* **10**:180-187.
31. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

32. Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D., Allen N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Particulate Sci. Technol.* **5**:27-37.
33. Sivan A., Chet I. (1989). Degradation of fungal cell wall by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J Gen Microbiol* **135**:675-682.
34. Screen S., Bailey A., Charnley K., Cooper R., Clarkson J. (1997). Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA binding protein CRR1 a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Curr Genet* **31**:511-518.
35. Screen S., Bailey A., Charnley K., Cooper R., Clarkson J. (1998). Isolation of a nitrogen response regulator gene (*nrr1*) from *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **221**:17-24
36. Schuller C., Brewster J. L., Alexander M. R., Gustin M. C., Ruis H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene *EMBO J.* **13**(18): 4382-4389.
37. Trumbly R.J., (1992). Glucosa repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Mol. Microbiol.* **6**(1):15-21.
38. Weindiing R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other fungi. *Phytopathology* **22**:837.
39. Wells H. D., Bell D. K., Jaworski C. A. (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **62**:442.