



## **TESIS DOCTORAL**

**“Aproximación molecular al antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Verticillium dahliae* para el biocontrol de la Verticilosis en genotipos de *Olea europaea* susceptibles y resistentes al patotipo defoliante”**

**IRENE CARRERO CARRÓN**

**DIRECTORES: Dr. RAFAEL M. JIMÉNEZ DÍAZ**

**Dra. M<sup>a</sup> ROSA HERMOSA PRIETO**

**Córdoba, Junio de 2016**

TITULO: *Aproximación molecular al antagonismo de Trichoderma spp. sobre Verticillium dahliae para el biocontrol de la Verticilosis en genotipos de Olea europaea susceptibles y resistentes al patotipo defoliante*

AUTOR: *Irene Carrero Carrón*

---

© Edita: UCOPress. 2016  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**“Aproximación molecular al antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Verticillium dahliae* para el biocontrol de la Verticilosis en genotipos de *Olea europaea* susceptibles y resistentes al patotipo defoliante”**

Tesis presentada por D<sup>a</sup>. Irene Carrero Carrón para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo

Fdo.: Irene Carrero Carrón

Vº Bº:

Los Directores de la Tesis

Dr. Rafael M. Jiménez Díaz  
Catedrático Emérito de Patología Vegetal  
Universidad de Córdoba

Dra. Mª Rosa Hemosa Prieto  
Profesor Titular del Departamento de  
Microbiología y Genética  
Universidad de Salamanca

Córdoba, Junio de 2016

D. **RAFAEL M. JIMÉNEZ DÍAZ**, Catedrático Emérito de Patología Vegetal del Departamento de Agronomía de la Univesidad de Córdoba y Dña. **Mª ROSA HERMOSA PRIETO**, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Genética y miembro del Instituto Hispanoluso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Universidad de Salamanca, directores de la presente Tesis Doctoral.

INFORMAN: Que el trabajo “**Aproximación molecular al antagonismo de *Trichoderma spp.* sobre *Verticillium dahliae* para el biocontrol de la Verticilosis en genotipos de *Olea europaea* susceptibles y resistentes al patotipo defoliante**”, que ha llevado La Ingeniero Agrónoma y Licenciada en Ciencias Ambientales D<sup>a</sup> Irene Carrero Carrón bajo nuestra dirección, lo consideramos ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Junio de 2016

Dr. Rafael M. Jiménez Díaz  
Catedrático Emérito de Patología Vegetal  
Universidad de Córdoba

Dra. Mª Rosa Hemosa Prieto  
Profesor Titular del Departamento de  
Microbiología y Genética  
Universidad de Salamanca



**TÍTULO DE LA TESIS:** Aproximación molecular al antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Verticillium dahliae* para el biocontrol de la Verticilosis en genotipos de *Olea europaea* susceptibles y resistentes al patotipo defoliante

**DOCTORANDO/A:** D<sup>ª</sup>. Irene Carrero Carrón

### **INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

El trabajo realizado por la Ingeniera Agrónomo y Licenciada en Ciencias Ambientales D<sup>ª</sup>. Irene Carrero Carrón, bajo nuestra dirección, lo consideramos finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba. La aproximación metodológica (cultivos *in vitro* e *in vivo* de hongos y olivo, análisis transcriptómico mediante “microarrays” de la interacción hongo-hongo, obtención de transformantes fúngicos marcados con fluorescencia y utilizados en estudios de microscopía confocal y análisis de expresión génica en plantas de acebuches mediante PCR cuantitativa, etc.) está de acuerdo con los objetivos planteados en el trabajo, y la Tesis constituye una contribución original al conocimiento del patosistema de la Verticilosis del olivo y al biocontrol con *Trichoderma* spp., con conclusiones basadas en resultados de investigación original.

Parte de los resultados alcanzados en este trabajo han dado lugar a un artículo científico en la revista “Crop Protection”: “*Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*” (en prensa, Doi: 10.1016/j.cropro.2016.05.009), y otro artículo “Transcriptomic analysis of *Trichoderma atroviride* overgrowing plant-wilting *Verticillium dahliae* identifies mycoparasitic candidate genes of the biocontrol fungus against this pathogen” que se encuentra en revisión en la revista “Applied and Environmental Microbiology”. En ambos trabajos, D<sup>ª</sup>. Irene Carrero Carrón figura como primera firmante.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 26 de Mayo de 2016

Firma del/de los director/es

Fdo.: Rafael M. Jiménez Díaz

Fdo.: María Rosa Hermosa Prieto



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de la ayuda:

**Beca de la Junta de Andalucía para Personal Investigador en  
Formación en Proyectos de Excelencia 2010.**

El trabajo aquí descrito se enmarca dentro del Proyecto de Excelencia  
AGR-6082 que lleva por título:

**“Manejo integrado de la Verticilosis del olivo causada por el patotipo  
defoliante de *Verticillium dahliae* mediante la utilización combinada de  
patrones de acebuche resistentes y hongos beneficiosos”, del Programa de  
Incentivos a los Agentes del Sistema Andaluz del Conocimiento.**

Córdoba, Junio de 2016

## *A mi familia*

“No hay nada de noble en ser superior a tus semejantes. La verdadera nobleza está en ser superior a tu yo anterior”.

Ernest Hemingway

## Siglas y abreviaturas

<b>μFD</b>	Microfaradio
<b>μg</b>	Microgramo
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μm</b>	Micrómetro
<b>μg/mL</b>	Microgramo por mililitro
<b>μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup></b>	Micromoles por metro cuadrado por segundo
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>6-PP</b>	6-pentil-α-pirona
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ACBs</b>	Agentes de control biológico
<b>ACS</b>	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa
<b>AND</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa A
<b>atm</b>	Atmósfera
<b>BLAST</b>	'Basic Local Alignment Search Tools'
<b>CAZy</b>	'Carbohydrate-Active enZymes'
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CIA</b>	Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CMS</b>	Harina de maíz:arena:agua desionizada (9:1:2)
<b>c.s.p.</b>	Cantidad suficiente para
<b>CTAB</b>	'Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide'
<b>CWDEs</b>	Enzimas de degradación de pared celular
<b>D</b>	Defoliante
<b>DAMPS</b>	'Damage-Associate Molecular Patterns'
<b>DEPC</b>	Diethyl pirocarbonato
<b>día</b>	Días después de la inoculación con el antagonista
<b>dip</b>	Días después de la inoculación con el patógeno
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino-tetracético
<b>EE.UU.</b>	Estados Unidos
<b>eGFP</b>	'Enhanced Green Fluorescent Protein'
<b>EIN</b>	'Ethylene insensitive'
<b>ESTs</b>	'Expressed sequence tags'
<b>ET</b>	Etileno
<b>ETI</b>	'Effector-Triggered Immunity'
<b>ETS</b>	'Effector-Triggered Susceptibility'
<b>FC</b>	'Fold change'
<b>FDR</b>	'False discovery rate'
<b>g</b>	Aceleración de la gravedad terrestre
<b>g</b>	Gramos
<b>GAs</b>	Giberelinas
<b>GO</b>	'Gene ontology'
<b>h</b>	Horas
<b>h/día</b>	Horas por día
<b>HR</b>	Repuesta de muerte celular hipersensible
<b>IAA</b>	Ácido indolacético

<b>IMI</b>	‘International Mycological Institute’
<b>ISR</b>	Resistencia sistémica inducida
<b>JA</b>	Ácido jasmónico
<b>JGI</b>	‘Join Genome Institute’
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>kV</b>	Kilovoltio
<b>L</b>	Litro
<b>LOX</b>	‘Lipoxygenase’
<b>MAMPS</b>	‘Microorganism-Associated Molecular Patterns’
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ms</b>	Milisegundo
<b>NCBI</b>	‘National Center for Biotechnology Information’
<b>ND</b>	No defoliante
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NRPs</b>	Péptidos no ribosómicos
<b>Ohm</b>	Ohmio
<b>PAL</b>	Fenilalanina-amonio liasa
<b>PAMPS</b>	‘Pathogen-Associated Molecular Patterns’
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKs</b>	Policétidos
<b>PR</b>	Relacionado con patogenicidad
<b>PTI</b>	PAMP-‘Triggered Immunity’
<b>p/p</b>	Peso por peso
<b>p/v</b>	Peso por volumen
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>RNAsa</b>	Ribonucleasa
<b>rmp</b>	Revoluciones por minuto
<b>ROS</b>	Especies de oxígeno reactivas
<b>s</b>	Segundos
<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>SAR</b>	Resistencia sistémica adquirida
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SMs</b>	Metabolitos secundarios
<b>spp.</b>	Especies
<b>Tris</b>	Tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>ufc</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>V</b>	Voltios
<b>VCG</b>	Grupo de compatibilidad vegetativa
<b>VO</b>	Verticilosis del olivo
<b>VOCs</b>	Compuestos orgánicos volátiles
<b>v/v</b>	Volumen por volumen
<b>WCMS</b>	Arena:salvado de trigo-arena de maíz (1:1):agua desionizada (9:1:2)
<b>eYFP</b>	‘Enhanced Yellow Fluorescent Protein’

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. OLIVO .....	3
1.1. Distribución e importancia económica del cultivo.....	3
1.2. Botánica.....	4
1.3. Principales plagas y enfermedades.....	4
2. VERTICILOSIS DEL OLIVO.....	6
2.1. Importancia y distribución geográfica de la enfermedad .....	6
2.2. Sintomatología .....	6
2.3. <i>Verticillium dahliae</i> .....	7
2.4. Control de la enfermedad .....	12
3. DEFENSA DE LA PLANTA CONTRA LA INFECCIÓN .....	15
3.1. Respuestas de defensa contra los patógenos .....	15
3.2. Redes de señalización de defensa en planta .....	17
4. <i>TRICHODERMA</i> SPP. ....	20
4.1. Morfología y sistemática.....	20
4.2. Ecología.....	21
4.3. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. como agentes de control biológico ..	22
4.4. Efectos beneficiosos en la planta .....	27
4.5. Aplicaciones de especies del género <i>Trichoderma</i> .....	31
5. “ÓMICAS” .....	32
5.1. “Ómicas” en <i>Trichoderma</i> spp.....	34
6. ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA EN <i>Trichoderma</i> spp.....	37
7. MONITORIZACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE LAS PLANTAS POR MICROORGANISMOS.....	38
<b>II OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	47
1.1. Bacterias.....	47
1.2. Hongos filamentosos.....	47
Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	47
Cepas de <i>Verticillium dahliae</i> .....	48
1.3. Material vegetal.....	48

2. VECTORES UTILIZADOS .....	49
3. MEDIOS DE CULTIVO.....	49
3.1. Medios de cultivo para hongos .....	50
3.2. Medios de cultivo para plantas.....	51
3.3. Medios de cultivo para bacterias.....	51
4. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS.....	53
4.1. Cultivo y mantenimiento de bacterias.....	53
4.2. Cultivo y mantenimiento de los hongos.....	53
4.3. Recogida de esporas.....	54
4.4. Crecimiento del olivo y acebuche .....	54
5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	54
5.1. Extracción de ADN.....	54
5.2. Purificación del ADN.....	57
5.3. Extracción de ARN .....	58
Método del TRIZOL <sup>®</sup> .....	58
ARN para ‘microarrays’ .....	58
ARN de acebuche y olivo.....	59
6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	59
6.1. Cuantificación y calidad de ácidos nucleicos.....	59
6.2. Manipulación enzimática de los ácidos nucleicos .....	60
6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	60
6.4. Electroforesis de ácidos nucleicos .....	64
6.5. Purificación .....	65
6.6. Secuenciación de ADN .....	65
7. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	66
7.1. Obtención de proteínas intracelulares .....	66
7.2. Cuantificación de proteínas intracelulares .....	66
7.3. Actividad proteasa.....	66
8. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA CONFRONTACIÓN <i>Trichoderma</i> <i>spp.-Verticillium dahliae</i> .....	67
8.1. Diseño de ‘microarray’ .....	67
8.2. Hibridación con sondas .....	67
8.3. Detección y análisis de los datos.....	67
9. TRANSFORMACIÓN DE ORGANISMOS .....	68

9.1. Construcción del vector de expresión de eYPF .....	68
9.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	69
9.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	70
Infección del hongo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	71
10. ENSAYOS <i>in vitro</i> DE ANTAGONISMO ENTRE HONGOS FILAMENTOSOS .....	72
10.1. Ensayos de antagonismo en cultivos duales .....	72
10.2. Ensayos de antagonismo en cultivos duales en medio discontinuo .....	72
10.3. Ensayos de antagonismo mediante el uso de membranas .....	73
11. ENSAYOS <i>in vivo</i> OLIVO- <i>Trichoderma</i> spp.- <i>Verticillium dahliae</i> .....	73
11.1. Capacidad de <i>Trichoderma</i> spp. para controlar VO.....	73
11.2. Colonización de la rizosfera del olivo por <i>Trichoderma</i> spp. ....	75
11.3. Ensayos para estudiar mediante confocal el proceso de infección y colonización de olivo por <i>Verticillium dahliae</i> .....	76
11.4. Ensayos para estudiar la señalización de defensa en planta.....	77
12. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER .....	78
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	79
14. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y ‘SOFTWARE’ UTILIZADOS.....	79
14.1. Búsqueda de secuencias similares en bases de datos .....	79
15. PROVEEDORES COMERCIALES .....	80
<b>IV RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
1. SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Verticillium dahliae</i> ....	83
1.1. Antagonismo en cultivo dual .....	83
1.2. Actividad antagonista en cultivos sobre membrana.....	84
1.3. Antagonismo en cultivo dual en medio discontinuo .....	86
1.4. Colonización de la rizosfera de plantas de olivo “Picual” .....	88
1.5. Supresión de la Verticilosis en plantas de olivo “Picual” .....	89
2. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma atroviride</i> T11 CONTRA <i>Verticillium dahliae</i> V-138I.....	91
2.1. Análisis de los cambios transcriptómicos de <i>Trichoderma atroviride</i> T11 ocasionados por <i>Verticillium dahliae</i> D V-138I.....	91
2.2. Actividad proteasa.....	99
2.3. Confirmación mediante qPCR de los resultados obtenidos en el análisis de ‘microarrays’ .....	99

3. MONITORIZACIÓN DE LA INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE OLIVO POR <i>Verticillium dahliae</i> Y PAPEL DE <i>Trichoderma</i> SPP. EN ESTOS PROCESOS .....	102
3.1. Obtención y selección de transformantes de <i>Trichoderma</i> spp. que expresan una proteína fluorescente.....	102
4. SEÑALIZACIÓN DE DEFENSA CONTRA <i>Verticillium dahliae</i> Y <i>Trichoderma harzianum</i> EN CLONES DE ACEBUCHE .....	113
<b>V DISCUSIÓN .....</b>	<b>121</b>
<b>VI CONCLUSIONES.....</b>	<b>141</b>
<b>VII BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>145</b>

# INTRODUCCIÓN

---

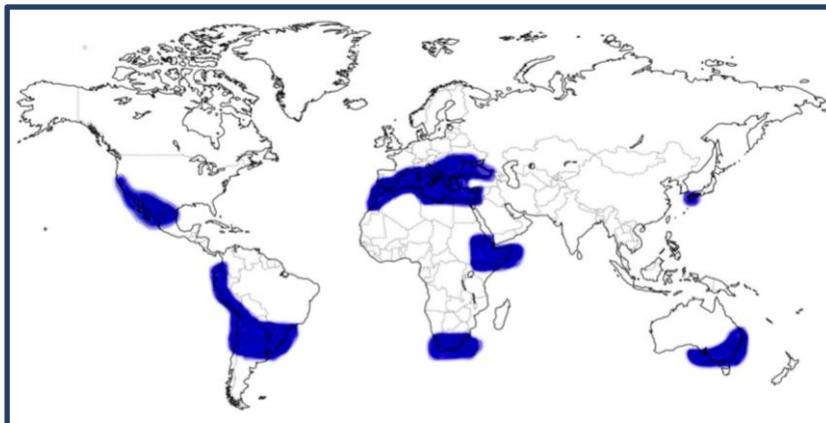


## 1. OLIVO

### 1.1. Distribución e importancia económica del cultivo

El Consejo Oleícola Internacional (COI) sitúa el origen del olivo (*Olea europaea* L.) en una zona que se extiende desde el sur del Cáucaso hasta la altiplanicie de Irán y la costa mediterránea de Siria y Palestina. La existencia de esta especie dataría del Neolítico, XII milenio a. C., y su introducción en España habría tenido lugar en la época de la civilización fenicia, cerca del año 1050 a. C. (COI, 2016).

El hábitat del olivo se concentra entre las latitudes 30° y 45°, tanto en el hemisferio norte como en el sur, en regiones con clima de tipo mediterráneo, caracterizadas por veranos secos y calurosos (Fig. 1) (Civantos, 2001).



**Figura 1.** Distribución geográfica mundial del olivo.

España se sitúa en el primer lugar mundial en cuanto a superficie cultivada de olivo y producción de aceite de oliva, seguido por Italia y Grecia (Faostat, 2015). El olivar está presente en todas las regiones españolas excepto Asturias y Cantabria, pero es en Andalucía donde se concentra más del 60% de la superficie olivarera nacional. En Castilla la Mancha se cultiva el 15,7% del olivar total, en Extremadura el 10,4% y las demás comunidades autónomas representan el 13,6% restante [MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente), 2012].

La producción oleícola española representa aproximadamente el 60% de la producción de la Unión Europea y el 45% de la mundial. La superficie dedicada a este cultivo en España es de 2.584.564 ha, que supone un 14% de la superficie agraria útil. España es el primer exportador mundial de aceite de oliva, ocupando el cuarto lugar entre los productos agroalimentarios exportados, solamente por detrás de los cítricos, el vino y la carne. El valor de la producción del sector de aceite de oliva se situó en torno a los 1,86 millones de euros entre los años 2007 y 2012. Esa cifra representa el 4,6% de la Producción Agraria y el 7,6% de la Agrícola. El cultivo del olivo tiene un marcado carácter social y se estima que genera unos 46 millones de jornales cada campaña (MAPA, 2012).

## 1.2. Botánica

El olivo es un árbol perennifolio perteneciente a la familia de las Oleaceae. Dentro del género *Olea*, se reconocen 35 especies diferentes, entre ellas, *O. europea*, la especie que agrupa a los olivos cultivados (subespecie *europaea*) y también a los acebuches u olivos silvestres (subespecie *sylvestris*). El acebuche se diferencia de la especie cultivada por tener un porte más arbustivo, espinas en las ramas y hojas y frutos más pequeños. El olivo se caracteriza por ser un árbol frondoso de 4 a 8 metros de altura, con tronco liso cuando es joven y retorcido, grueso y lleno de nudosidades a medida que envejece, y con la corteza de color gris a verde grisáceo. Sus hojas son simples, opuestas, coriáceas lanceoladas, con borde entero y de un color verde oscuro por el haz y de color blanco plateado por el envés. Presenta flores de pequeño tamaño, con cuatro pétalos de color blanco o blanco-amarillento, y reunidas en inflorescencias. El fruto del olivo es la aceituna, una drupa ovoide que aumenta su contenido en aceite a medida que madura. Su tamaño, forma y color dependen de la variedad específica, aunque suele medir entre 1,5 y 3,0 cm. El color del fruto es verde al principio, adquiere tonos violetas a medida que madura, y termina por transformarse en una aceituna negra, más o menos rugosa (Rapoport, 2001).

En España se han identificado más de 262 variedades cultivadas, muchas de las cuales son nativas y están confinadas a un área geográfica determinada (Belaj y col., 2001). Las variedades más representativas, de mayor a menor superficie cultivada, son: Picual, Cornicabra, Hojiblanca, Manzanilla, Lechín de Sevilla, Morisca, Empeltre, Arbequina y Picudo (Barranco, 2001).

## 1.3. Principales plagas y enfermedades

El olivo es susceptible al ataque de numerosos artrópodos fitófagos y organismos fitopatógenos que mantienen un frágil equilibrio con su huésped. La interrupción de este equilibrio, que sucede con relativa frecuencia debido a la variabilidad del clima mediterráneo, determina que el olivar sufra pérdidas de cosecha considerables que pueden llegar a comprometer la capacidad productiva, o incluso, la vida del árbol. Desgraciadamente, esta situación se ha podido constatar en los últimos años debido a las condiciones climáticas especialmente favorables para el desarrollo de algunas enfermedades (Trapero y col., 2011).

El sistema de cultivo es uno de los factores más importantes que contribuye a alterar el mencionado equilibrio. Así, la expansión de la Moderna olivicultura intensiva caracterizada por una limitada diversidad genética y amplia homogeneidad geográfica de la estructura varietal, al difundirse solo las “mejores” variedades, y un sistema más intensificado de cultivo (alta densidad de plantación, regadío, fertilizantes, mecanización, cubiertas vegetales, etc.), conlleva también una mayor dificultad para el control de plagas y enfermedades. Un ejemplo que parece apoyar esta posibilidad es la Verticilosis del olivo (VO), desconocida hace 40 años y cuyo agente podría haber

existido anteriormente sin dar lugar a epidemias severas (De Andrés, 1991; Trapero y col., 2011).

Las plagas y enfermedades del olivo son causadas por insectos, hongos, oomicetos, bacterias, virus, fitoplasmas, nematodos, fanerógamas parasíticas y agentes abióticos (Tabla 1). Actualmente, la plaga más importante del olivar es la Mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) mientras que la VO es considerada la enfermedad más grave de los olivares jóvenes (Jiménez-Díaz y col., 2012).

**Tabla 1.** Principales enfermedades del olivo (adaptado de Trapero y col., 2011).

<b>Enfermedad</b>	<b>Agente causal</b>	<b>Importancia</b>
<b><u>Micosis aéreas</u></b>		
Repilo	<i>Fusicladium oleagineum</i>	E
Antrancnosis	<i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i>	M
Emplomado	<i>Pseudocercospora cladosporioides</i>	M
Negrilla	<i>Capnodium elaeophilum</i>	B
Escudete	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	B
Lepra	<i>Phlyctema vagabunda</i>	B
Otras podredumbres de fruto	Especies de <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Diplodia</i> , <i>Fusarium</i>	B
Chancros	<i>Neufosicoccum mediterraneum</i> , <i>Eutypa lata</i>	B
Caries del tronco	Especies de <i>Fomes</i> , <i>Fomitiporia</i> , <i>Phellinus</i> , <i>Polyprous</i> , <i>Sterum</i>	B
<b><u>Micosis radicales</u></b>		
Verticilosis del olivo	<i>Verticillium dahliae</i>	E
Podredumbre raíces gruesas	<i>Armillaria mellea</i> , <i>Rosellinia nectrix</i> , <i>Omphalotus olearius</i>	B
Podredumbre de raicillas	Especies de <i>Phytophthora</i> , <i>Cylindrocarpon</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i>	M-B
<b><u>Bacteriosis</u></b>		
Tuberculosis	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	E-M
<b><u>Virosis y Fitoplasmosis</u></b>		
Malformaciones, Amarillez	Virus y fitoplasmas no identificados	S
Infecciones latentes, Amarillez	<i>Nepovirus</i> , <i>Cucumovirus</i> , <i>Oleavirus</i>	S
<b><u>Nematodos</u></b>		
Nódulos/ Lesiones radicales	Especies de <i>Meloidogyne</i> , <i>Pratylenchus</i>	S
<b><u>Fanerógamas</u></b>		
Muérdago, Marajo, Cuscuta	Especies de <i>Viscum</i> , <i>Cuscuta</i>	S
<b><u>Abióticas</u></b>		
Deficiencias de nutrientes	Boro, hierro, potasio, etc.	M-B
Daños diversos	Heladas, sequía, encharcamiento	E-B

E: elevada, M: moderada, B: baja, S: sin importancia práctica general, aunque ocasionalmente se han observado graves ataques.

## 2. VERTICILOSIS DEL OLIVO

### 2.1. Importancia y distribución geográfica de la enfermedad

El agente causal de la VO es *Verticillium dahliae* Kleb., patógeno que se aisló inicialmente de dalia, una planta herbácea. La enfermedad se diagnosticó por vez primera en Italia hace ya 70 años (Ruggieri, 1946); desde entonces, la VO se fue describiendo por todos los países del área mediterránea y, también, en California. En España, se identificó por primera vez en 1975 (Caballero y col., 1980), y a principios de los 80's ya estaba ampliamente distribuida por el Valle del Guadalquivir, desde donde se extendió a otras provincias andaluzas y regiones olivareras (Jiménez-Díaz y col., 2012). Un estudio llevado a cabo sobre 90 olivares andaluces, tomados al azar, mostró una prevalencia de la VO de un 71%, con una incidencia media del 20% en los olivares afectados (López-Escudero y col., 2010).

La VO puede atacar a olivos de todas las edades pero la incidencia y severidad de la enfermedad son mayores en árboles jóvenes, de 2 a 10 años. La importancia de los ataques no solo derivaría de la eventual muerte del árbol enfermo, sino también de las pérdidas de cosecha que ocasiona la enfermedad en los árboles supervivientes afectados (Levin y col., 2003; Jiménez-Díaz y col., 2012).

### 2.2. Sintomatología

La VO comprende dos síndromes, denominados defoliante (D) y no defoliante (ND) (Navas-Cortés y col., 2008). El **síndrome de D** se caracteriza por la caída rápida y extensa de las hojas verdes asintomáticas de brotes y ramas individuales, que pueden quedar completamente defoliados, y generalmente da lugar a la muerte de dichos órganos o de la planta completa. Estos síntomas se pueden desarrollar desde finales de otoño hasta finales de primavera. En el **síndrome ND**, en el que no se produce dicha defoliación, se pueden diferenciar dos complejos sintomáticos, conocidos como “apoplejía” o forma aguda de la enfermedad y “decaimiento lento” o forma crónica (Blanco-López y col., 1984; Jiménez-Díaz y col., 1998). La apoplejía se desarrolla entre final de invierno y principio de primavera, e incluye clorosis, enrollado y muerte rápida y extensa de las hojas, sin caída de las mismas, seguido de la muerte de brotes y ramas y, eventualmente, del árbol completo. Con frecuencia, la corteza de los tejidos leñosos afectados adquiere una tonalidad púrpura azulada. El “decaimiento lento”, se desarrolla en primavera y progresa lentamente hasta comienzo del verano, se caracteriza por necrosis de las inflorescencias, momificado de las flores, coloración verde mate, enrollado y necrosis de las hojas, que eventualmente caen desde las zonas interiores de los brotes una vez necrosadas. Usualmente, los síntomas en las inflorescencias aparecen antes de la clorosis foliar (Blanco-López, 1984; Jiménez-Díaz y col., 2012).

En ambos síndromes, los tejidos vasculares de los brotes y ramas afectados muestran una coloración castaño oscuro y los frutos se desecan, arrugan y pierden peso. Aunque el síndrome D pueden ser letal para las plantas afectadas, los síntomas pueden

remitir en olivos afectados por el síndrome ND de manera que la VO puede tender a desaparecer en un olivar afectado por este síndrome si no se producen nuevas infecciones anuales (Jiménez-Díaz, 2010).

El desarrollo de los síntomas en olivo es variable, siendo influido por la densidad de inóculo inicial del patógeno en el suelo, las condiciones del suelo y las condiciones medioambientales (López-Escudero y Blanco-López, 2007). Se ha observado que una temperatura del suelo entre 16 y 24°C es más favorable para el síndrome D, pero para el ND se situaría entre 16 y 20°C (Calderón y col., 2014).

Un estudio reciente ha mostrado que parámetros como el contenido en clorofila, la fluorescencia de ésta y la temperatura de las hojas pueden servir de indicadores para detectar la VO en las primeras etapas de su desarrollo, mientras que la producción de etileno (ET) y el índice de reflectancia fotoquímico serían indicadores de estadios avanzados de esta enfermedad (Calderón y col., 2014).

Como se ha indicado anteriormente, en olivo, al igual que en otras plantas leñosas, se ha observado que puede tener lugar una disminución progresiva de la VO en el transcurso de los años, e incluso, una recuperación natural de la planta siempre y cuando no se produzcan nuevas infecciones. La interpretación fitopatológica de dicho fenómeno es que en condiciones de infección de severidad moderada, la recuperación sintomatológica de los olivos está asociada con la inactivación de *V. dahliae* en sus tejidos, de manera que son necesarias nuevas infecciones a través del sistema radical de la planta para que la enfermedad se desarrolle de nuevo (Wilhelm y Taylor, 1965; Mercado-Blanco y col., 2001; Jiménez-Díaz, 2010).

### 2.3. *Verticillium dahliae*

*Verticillium dahliae* es un hongo haploide, de reproducción estrictamente asexual capaz de infectar más de 400 especies de plantas herbáceas anuales cultivadas o arvenses o leñosas cultivadas u ornamentales (Pegg y Brady, 2002). Análisis de filogenia molecular indican que *V. dahliae* se ubica en la familia Plectosphaerellaceae de la subclase Hypocreomycetidae, clase Sordariomycetes en los Ascomicetos (Spatafora y col., 2006; Zare y col., 2007; Zhang y col., 2006). Además, estudios recientes indican que el genoma de cepas de *V. dahliae*, de diverso origen geográfico, contiene solo uno (*MAT1-2*) de los dos idiomorfos del gen *MAT* que regula la reproducción sexual en los Ascomicetos (Usami y col., 2009); si bien subsiguientemente se identificó el idiomorfo *MAT1-1* en algunas cepas de *V. dahliae* deficientes en *MAT1-2*, indicando que *V. dahliae* es potencialmente heterotálico, pero que su reproducción sexual es improbable, porque la distribución de los dos tipos de compatibilidad sexual en las poblaciones del hongo estudiadas hasta ahora presentan un marcado desequilibrio hacia *MAT1-2* (Usami y col., 2009). Hace ya una década que se publicó el genoma mitocondrial de *V. dahliae* (Pantou y col., 2006) y, actualmente, está disponible el genoma completo de este patógeno en la página 'web' [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium\\_dahliae/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html)

(Klosterman y col., 2011). *Verticillium dahliae* junto con *V. albo-atrum* son las especies que poseen mayor cobertura científica entre las 10 que actualmente comprende el género *Verticillium* (Inderbitzin y col., 2011) debido a su gran importancia agrícola (Fradin y Thomma, 2006). *Verticillium dahliae* es, como se dijo anteriormente, el agente causal de la VO. Este hongo forma micelio y conidias hialinas agrupadas en microgotas mucilaginosas sobre el extremo de fiálidas uninucleadas dispuestas en verticilos sobre conidióforos hialinos no ramificados, y microesclerocios negruzcos de tamaño y forma variables (Jiménez-Díaz y col., 2012). Esta especie se puede cultivar fácilmente en medios definidos o medios con extractos vegetales, y tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 24 y 27°C, según cepas (Jiménez-Díaz y col., 2012). Se desaconseja su cultivo continuo en medios que promuevan su crecimiento miceliar, pues conlleva una reducción de conidias y microesclerocios, con la consiguiente pérdida de virulencia.

Este hongo es ecológicamente un simbiote obligado con nutrición necrotrofa, habitante típico de raíces *sensu* Garret, que desarrolla una prolongada fase parasítica circunscrita al xilema de la planta infectada y escasa o nula actividad saprofitica en el suelo, en el cual sobrevive mediante microesclerocios libres o inmersos en restos vegetales (Pegg y Brady, 2002).

### 2.3.1. Diversidad genética

El estudio de la diversidad genética de *V. dahliae* se ha realizado principalmente mediante el análisis de grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) (capacidad genéticamente determinada de que las hifas de dos aislados anastomosén y formen un heterocarionte estable, en cuyo caso, dichos aislados se asignan a un mismo VCG) y el análisis del ADN genómico del hongo. Inicialmente, mediante bioensayos utilizando mutantes naturales auxotróficos en el uso de nitrato (mutantes *nit*), se identificaron seis VCGs en *V. dahliae*, denominados de VCG1 a VCG6 (Joaquim y Rowe, 1990; Bath y col., 2003), en tres de los cuales (VCG1, VCG2 y VCG4) se han diferenciado los subgrupos A y B, basados en el vigor y en la frecuencia de complementación prototrófica. La estructura de las poblaciones de *V. dahliae* en VCGs fue interpretada inicialmente como correspondiente de la estructura clonal predecible en un hongo mitospórico, y la asignación de los aislados a VCG es de utilidad diagnóstica y epidemiológica porque existe cierta correspondencia entre la virulencia de los aislados de *V. dahliae* sobre un cultivo y su VCG, por ejemplo, los aislados de VCG1A son más virulentos sobre algodón y olivo comparado con la de los aislados de VCG2A, 2B, o 4B, mientras que los aislados del VCG2B son más virulentos sobre alcachofa que los de VCG1A y los de VCG4A y VCG4B son más virulentos sobre patata que los de otros VCGs (Jiménez-Díaz y col., 2011, 2012). Sin embargo, estudios más recientes, basados en el polimorfismo de la región espaciadora intergénica (IGS) y polimorfismos en un único nucleótido (SNP), han puesto de manifiesto que algunos VCGs puede contener aislados genéticamente heterogéneos, es decir, la compatibilidad en un VCG ser filogenéticamente convergente (polifilética) en lugar de monofilética y derivar de un

antepasado común (Collado-Romero y col., 2008; Jiménez-Gasco y col., 2014). No obstante, estudios recientes de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) identificados mediante genotipado por secuenciación (GBS) han confirmado la estructura clonal en *V. dahliae* e identificado nueve linajes clonales (Milgroom y col., 2014) que coinciden básicamente con los VCGs descritos previamente mediante VCGs y análisis de AFLPs y secuencias de varios genes conservados (Collado-Romero y col., 2006).

### 2.3.2. Patogenicidad

*Verticillium dahliae* está ampliamente distribuido en todo el mundo y es capaz de infectar más de 400 especies vegetales (Jiménez-Díaz y col., 2012). Este hongo no muestra patogenicidad huésped-específica, pero la virulencia de sus poblaciones responde a una adaptación progresiva a las plantas huésped con las que interacciona prolongadamente, es decir, poseen patogenicidad cruzada y capacidad adaptativa (Bhat y Subbarao, 1999; Jiménez-Díaz y col., 2012). Debido a esta patogenicidad cruzada y como consecuencia de adaptaciones sobre otros huéspedes, eventualmente, pueden originarse nuevos patotipos y razas patogénicas (Schnathorst y Mathre, 1966; Jiménez-Díaz y col., 2008a).

Los aislados de *V. dahliae* que infectan olivo se pueden clasificar en los patotipos defoliante (D), altamente virulento y letal, y no defoliante (ND), menos virulento. Esta clasificación está basada en su capacidad para producir o no el síndrome defoliante en la planta (Schnathorst y Sibbett, 1971; Jiménez-Díaz y col., 2012).

### 2.3.3. Proteínas de bajo peso molecular secretadas por *V. dahliae* durante la colonización de la planta

El genoma de *V. dahliae* fue secuenciado por el Instituto BROAD y existe una versión anotada del mismo, disponible a través de la página del 'Joint Genome Institute' (JGI, dependiente del Departamento de Energía de los EE.UU.) <http://genome.jgi.doe.gov/Verda1/Verda1.home.html> (Klosterman y col., 2011). Como para otros patógenos, la disponibilidad de un genoma ha acelerado los estudios encaminados a identificar genes implicados en el crecimiento vegetativo y la patogenicidad de *V. dahliae* (Luo y col., 2014; De Saint y Rep, 2015).

Para profundizar en el conocimiento del proceso de infección de *V. dahliae* es importante descubrir cuáles son los genes implicados en las distintas cascadas de señalización de defensa en la planta invadida. Durante el proceso de invasión de una planta, los hongos confrontan barreras estructurales y para superalas poseen genes codificadores de enzimas de degradación de pared celular (CWDEs). Una familia de proteínas importante en *V. dahliae* es la de las pectato liasas 11, solo identificada en hongos vasculares, sugiriendo que esta familia puede ser necesaria para el crecimiento del hongo dentro del xilema (Klosterman y col., 2011). También, la isocorismato mutasa, enzima que convierte isocorismato en 2,3-dihidroxibenzoato, se ha relacionado

con un aumento de la susceptibilidad de la planta a *V. dahliae* debido a su capacidad para manipular la biosíntesis del ácido salicílico (SA) en la planta (Liu y col., 2014).

En el genoma de *V. dahliae* se encuentran anotados aproximadamente 120 genes que codifican hipotéticas proteínas que contienen menos de 400 aminoácidos y al menos cuatro residuos de cisteína (Klosterman y col., 2011), por tanto, estas proteínas serían hipotéticos efectores, entendiendo como efector, cualquier molécula capaz de suprimir la defensa tipo “Respuesta Inducible Primaria” (PTI) de la planta. En la región común del genoma (‘core genome’) de este hongo se han identificado cuatro proteínas que muestran homología con el efector LysM de *Cladosporium fulvum* (De Jonge y Thomma, 2009). Inicialmente, estudios realizados en tabaco y tomate parecían indicar que estas proteínas de *V. dahliae* no estuvieran implicadas en patogenicidad, sin embargo, la posterior descripción de LysM VDAG 05180, en la cepa VdLs17 de *V. dahliae*, como un efector necesario para el desarrollo de la enfermedad y la colonización de la planta, sugiere que estos hipotéticos efectores pudieran actuar como factores de virulencia en cepas específicas (De Jonge y col., 2013; Kombrink, 2014).

Las plantas poseen genes *R* que codifican proteínas de resistencia (*R*), capaces de detectar proteínas del patógeno denominadas factores de avirulencia o proteínas Avr. En el caso de producirse una interacción (directa o indirecta), planta-patógeno, las proteínas *R* reconocerían a las proteínas Avr desencadenando una respuesta inmunitaria en las plantas que detendría la infección (interacción incompatible). Si no se produce el reconocimiento, el patógeno sería capaz de infectar la planta desarrollando la enfermedad, considerándose la planta susceptible y la cepa del patógeno virulenta (interacción compatible) (Flor, 1971; Van der Biezen y Jones, 1998). En este sentido, las cepas de *V. dahliae* que causan enfermedad en tomate se han dividido en dos razas: las cepas de la raza 1 son reconocidas por el gen *Ve1* de resistencia en la planta, mientras que aquellas de la raza 2 no son reconocidas y, por tanto, causan infección en el tomate (Schaible y col., 1951; Fradin y col., 2009). Comparando los genomas de cepas de ambas razas, se ha identificado el gen de avirulencia *Ave1*, el cual se induce durante la infección y su proteína relativa es reconocida por *Ve1*. Como *Ave1* muestra homología con ‘plant natriuretic peptides’ (PNPs), se ha sugerido que *V. dahliae* ha adquirido el *Ave1* por transferencia horizontal de las plantas (De Jonge y col., 2012).

Como *Ave1* y el gen que codifica el efector LysM VDAG 05180 se localizan en las regiones del genoma consideradas específicas de linaje (LS) (‘Lineage-Specific genomic región’, LS), se ha sugerido que otros genes que contribuirían a la virulencia de algunas razas del patógeno se deberían localizar en estas regiones (De Jonge y col., 2013).

Se han descrito numerosos genes que están directa o indirectamente relacionados con la patogenicidad de *V. dahliae*, entre los que se encuentran *Vta2*, *VdE-1*, *VdSSP1*, *VdSNF1*, *CPC1*, *VdThi4*, *VMK1*, *VdPKAC1*, *VdSge1* y *VdMSF* (Rauyaree y col., 2005; Novo y col., 2006; Tzima y col., 2010, 2011; Maruthachalam y col., 2011; Santhanam y Thomma, 2013; Liu y col., 2013a, b; Hoppenau y col., 2014; Luo y col., 2014). Por

ejemplo, *Vta2* es un activador transcripcional que controla la infección de la raíz de la planta huésped (Tran y col., 2014), y *CPC1*, regulador general de la biosíntesis de aminoácidos, que permite que el hongo se adapte a las condiciones intracelulares que se encuentra cuando penetra en la raíz (Timpner y col., 2013).

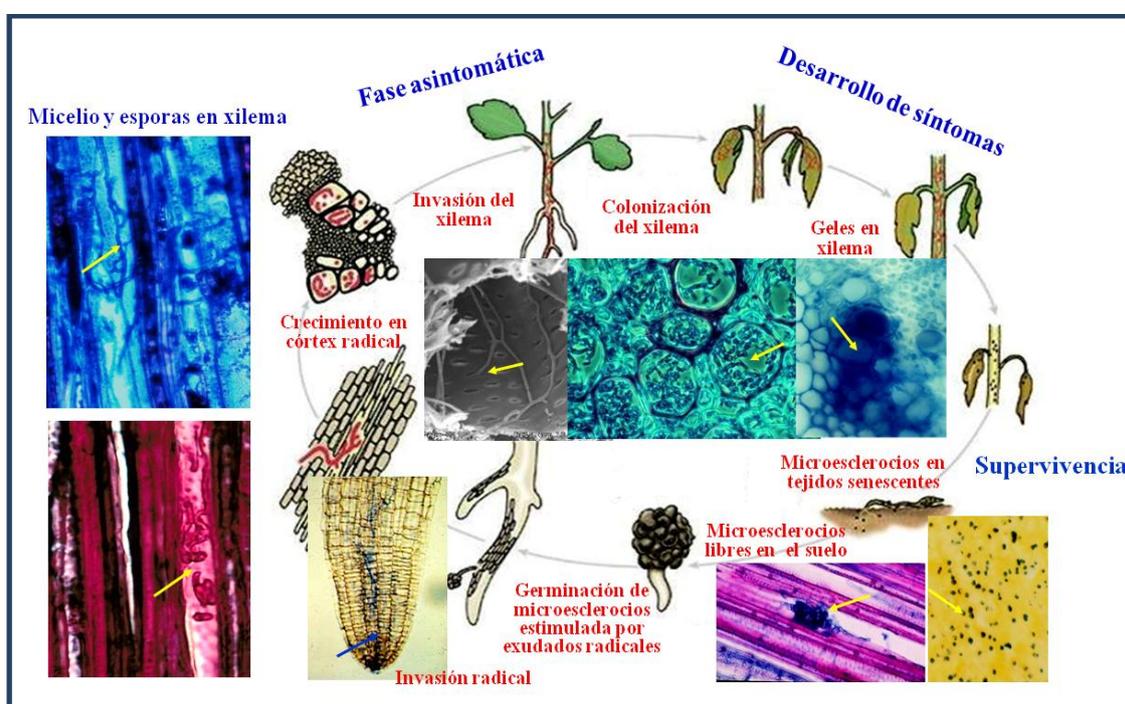
Hasta la fecha se han identificado como genes implicados en el crecimiento vegetativo del hongo a los *VdNLP*, que codifican proteínas relacionadas con el desarrollo de hifas y conidióforos (Zhou y col., 2012; Santhanam y col., 2013), y *VDHI* y *Vdgrp1*, que codifican proteínas implicadas en la formación de microesclerocios (Klimes y col., 2008; Gao y col., 2010).

Un estudio de genómica comparativa de genes de crecimiento vegetativo y genes de patogenicidad ha mostrado que, en la mayoría de los casos, los primeros están relacionados con patogenicidad pero esto no ocurre a la inversa, muchos genes de patogenicidad no afectan al crecimiento del hongo (Luo y col., 2014). En este sentido, de los ocho genes de crecimiento vegetativo descritos en la familia *VdNLP*, solo *VdNLP1* y *VdNLP2* tienen capacidad para causar lesiones necróticas y respuestas de defensa en plantas de tomate y *Arabidopsis* (Zhou y col., 2012; Santhanam y col., 2013).

#### 2.3.4. Ciclo de patogénesis

El ciclo de patogénesis de la VO se representa de forma esquemática en la Fig. 2 y comprende cuatro fases principales. **(i) Supervivencia**, los responsables de ésta y de la dispersión del patógeno son los microesclerocios producidos por *V. dahliae*, que pueden mantenerse, en dormición fungistásica, hasta 14 años en las primeras capas del suelo en ausencia de plantas huésped (Wilhelm, 1955); **(ii) Infección**, *V. dahliae* invade la planta mediante hifas formadas por la germinación repetida de los microesclerocios que es estimulada por exudados radicales de plantas huésped y no huésped (Levy e Isaac, 1976). La invasión de la planta puede tener lugar directamente a través de la epidermis intacta, por las zonas de la raíz en proceso de diferenciación y elongación próximas al ápice radical, o por las zonas de inserción de raíces secundarias, y está claramente favorecida por heridas de diversa naturaleza. Tras la penetración directa de la epidermis radical, el hongo crece intra- e intercelularmente hasta alcanzar el tejido cortical (Jiménez-Díaz, 2010). **(iii) Colonización y sintomatología**, el desarrollo de síntomas de la VO requiere la invasión y colonización extensa y sistémica del xilema por el hongo a lo largo del eje de la planta, por medio de conidias translocadas en los vasos por la corriente transpiratoria y de hifas que crecen longitudinal y transversalmente a través de los poros entre los elementos xilemáticos adyacentes (Rodríguez-Jurado y col., 1993; Baidez y col., 2007). El crecimiento del patógeno permanece confinado en el xilema durante su fase parasítica, pero esta restricción desaparece con el desarrollo de síntomas severos y la senescencia de la planta, pudiendo entonces crecer y formar microesclerocios en los tejidos extraxilemáticos de raíz y tallo (Jiménez-Díaz y col., 1998). La invasión de los vasos xilemáticos por el patógeno va unida a la formación de

tíldes y al desarrollo de geles de polisacáridos en la planta (Rodríguez-Jurado y col., 1993; Baidez y col., 2007). **(iv) Dispersión e incorporación de los microesclerocios al suelo**, la dispersión de los microesclerocios de *V. dahliae* dentro y entre plantaciones está favorecida por elementos como el movimiento del suelo, el transporte de cosechas, la presencia de restos de vegetales afectados, el viento y, sobretodo, el uso de plantones infectados, procedentes de viveros, y el uso de agua de riego contaminada (Wilhelm y Taylor, 1965; Schnathorst y Sibbett, 1971; Jiménez-Díaz y col., 1998, 2008b). Los microesclerocios de *V. dahliae* se incorporan al suelo tras la descomposición de los tejidos infectados muertos de plantas cultivadas o arvenses susceptibles, así como en las heces y estiércol de animales que se hayan alimentado de ellos, y las raíces de huéspedes asintomáticos de cubiertas vegetales (Jiménez-Díaz, 2010).



**Figura 2.** Ciclo de patogénesis de la VO causada por *V. dahliae*.

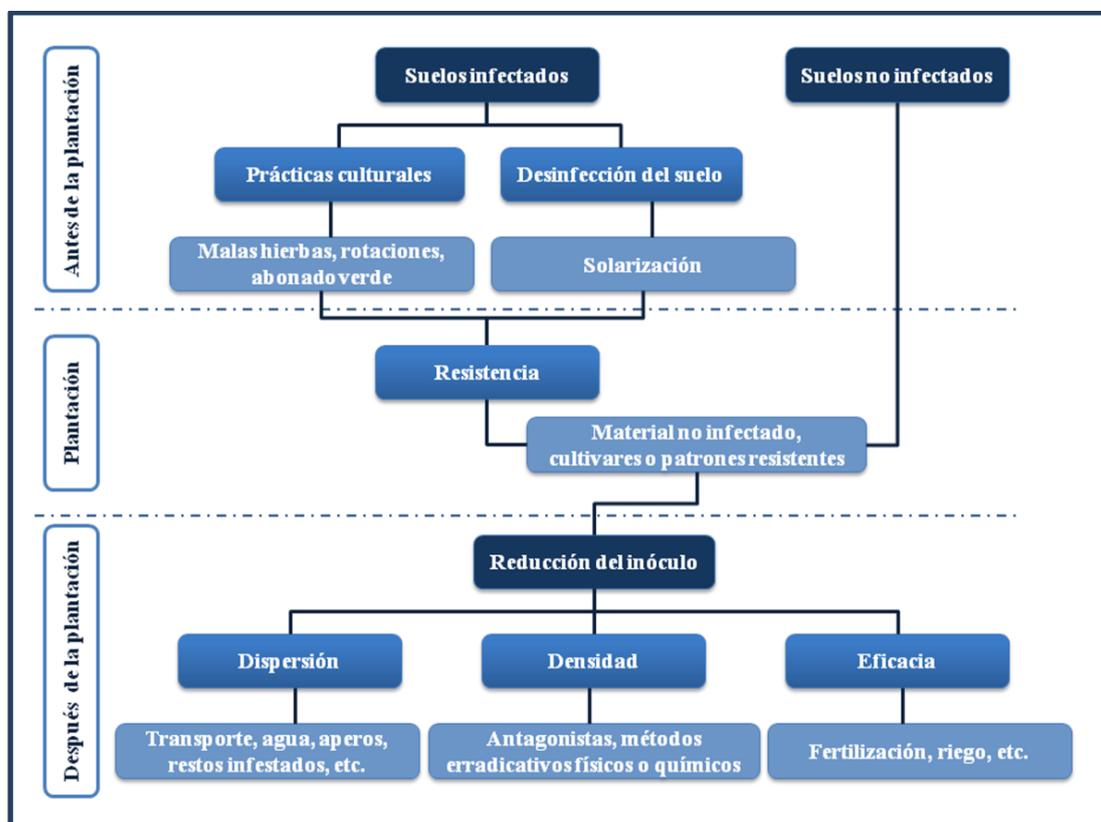
En los olivares infectados, las hojas verdes y asintomáticas caídas pueden desempeñar un papel relevante en la diseminación de *V. dahliae* dentro y, posiblemente, entre plantaciones, y actúan como fuente de inóculo efectiva para nuevas infecciones (Navas-Cortés y col., 2008).

#### 2.4. Control de la enfermedad

La VO es una enfermedad compleja para la que no existen en la actualidad soluciones simples, su control se ve dificultado considerablemente por las características de su patogénesis, entre las que se encuentran: (i) su capacidad para

infectar varios centenares de plantas y de sobrevivir mediante microesclerocios en el suelo durante largos periodos de tiempo, (ii) la inaccesibilidad al mismo por su ubicación en el xilema, (iii) la versatilidad de medios por los que se puede dispersar el patógeno, particularmente el patotipo D, (iv) la amplia gama de cultivos susceptibles y (v) la ausencia de materias activas, permitidas por la Unión Europea, que hayan demostrado experimentalmente su eficacia frente a este hongo (Jiménez-Díaz y col., 2003).

Debido a las anteriores características, el control de la VO debe basarse en una estrategia de manejo integrado que incluya medidas de carácter preventivo, aplicadas antes de la plantación, y medidas subsiguientes, que mitiguen la severidad y repercusión de los ataques sobre el árbol infectado (Tjamos, 1993; Tjamos y Jiménez-Díaz, 1998; Jiménez Díaz y col., 2003) (Fig. 3).



**Figura 3.** Estrategia de lucha integrada contra la VO.

Las medidas preventivas son las más eficaces y, también, resultarían las más económicas para el olivicultor. Entre ellas se incluirían: plantar en suelos no infestados, utilizar cultivares o patrones resistentes a *V. dahliae* y que el materia vegetal de partida esté libre del patógeno. Si se planta en suelos infestados, la rotación con cultivos no susceptibles antes de la plantación es eficaz únicamente si hubiera infestaciones ligeras del suelo. Con cantidades grandes de inóculo en el suelo, los métodos erradicativos que han resultado más eficaces son el abonado en verde (ejemplo: pasto de Sudán) y la

solarización del suelo. También es importante tener en cuenta la existencia de malas hierbas ya que éstas pueden mantener o incrementar los niveles de inóculo (Barranco, 2001).

A largo plazo, la utilización de cultivares de olivo resistentes a la infección o tolerantes a la enfermedad es la medida de lucha más práctica y económicamente eficiente para el manejo de la VO (Arias-Calderón y col., 2015). En este sentido, los clones de acebuche Ac-4, Ac-13 y Ac-18 han demostrado tener un alto potencial como portainjertos con resistencia duradera a *V. dahliae* D en suelos con altas dosis de inóculo del patógeno ( $2 \times 10^7$ ), incluso cuando éste se combina con el nematodo *Meloidogyne javanica* (Palomares-Rius y col., 2016). Con la excepción de los cultivares moderadamente susceptibles al patotipo D de *V. dahliae* “Koroneiki”, “Oblonga” y ‘Sevillenca’, y de los resistentes al mismo “Changlot Real”, “Empeltre” y “Frantoio”, la mayoría son muy susceptibles a este patotipo, por tanto, la utilización de patrones resistentes es una alternativa para el manejo de la VO (López-Escudero y col., 2004; Martos-Moreno y col., 2006).

Tras la plantación, las medidas de lucha deben de ir dirigidas a reducir el desarrollo de la enfermedad. Las estrategias consisten en: (i) métodos excluyentes, que impidan el acceso del patógeno al campo y su posterior distribución, (ii) métodos erradicativos, que reduzcan la densidad de inóculo en el suelo y limiten su crecimiento mediante control de las malas hierbas, destrucción de restos infestados, solarización, etc., y (iii) métodos de escape, que reduzcan la eficacia del patógeno para causar enfermedad, como por ejemplo reduciendo la dosis de riego y aplicándola durante el verano, un periodo desfavorable para el patógeno, o disminuyendo el uso de abonos nitrogenados (Barranco, 2001).

Como complemento a las medidas descritas anteriormente, algunos trabajos han mostrado como el uso de agentes de control biológico (ACBs), particularmente microorganismos pertenecientes a *Pseudomonas fluorescens* o diferentes cepas de *Trichoderma* spp., pueden tener eficacia frente a la VO (Mercado-Blanco y col., 2004; Jiménez-Díaz y col., 2009; Vitullo y col., 2013). En este sentido, se evaluó la eficacia de un bioformulado registrado en el en el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) como Bioten<sup>®</sup>, compuesto por *Trichoderma asperellum* ICC012 y *Trichoderma gamsii* ICC080, frente a la VO causada por el patotipo D de *V. dahliae*, en estudios *in vivo* realizados en microparcels con olivo de la variedad Picual. Los resultados mostraron que el bioformulado utilizado al 1% redujo significativa y consistentemente hasta en un 30% la severidad y entre un 18% y un 60% la incidencia de la enfermedad, bajo altas condiciones de inóculo del patógeno (Jiménez-Díaz y col., 2009). A su vez, tratamientos repetidos del sistema radical de los plantones con dicho formulado redujeron un 60% la severidad del ataque por el patógeno y evitaron la mortalidad de olivos de 2 años de edad, en condiciones que facilitaron aporte continuo de nuevo inóculo del patógeno por la defoliación de las plantas enfermas y determinaron una incidencia de 100% y la muerte del 30% de los plantones no tratados (Jiménez-Díaz y col., 2009). Entonces, este trabajo valida la

hipótesis de que un tratamiento del sistema radical del plantón con ACBs, en el vivero y tras el trasplante, puede reducir el potencial de la VO en árboles jóvenes y facilitar la expresión del fenómeno de recuperación sintomatológica.

### 3. DEFENSA DE LA PLANTA CONTRA LA INFECCIÓN

#### 3.1. Respuestas de defensa contra los patógenos

Las plantas tienen mecanismos de defensa frente a los patógenos, cuya comprensión es fundamental para diseñar nuevas estrategias para control de enfermedades. Dichos mecanismos comprenden en primer lugar, un sistema de defensa constitutiva o preexistente y, en segundo lugar, otro de respuesta inducible. Ambos sistemas son específicos de cada vegetal en cuestión, ya que son consecuencia de la memoria genética de la planta (Luo y col., 2014).

La defensa constitutiva, asociada a condiciones preexistentes en la planta, puede tener un carácter estructural como es el caso de la lignina, los tricomas o las ceras, o estar asociada a productos del metabolismo secundario como son los fenoles, flavonoides, isoflavonoides, glucosinolatos, etc., que en muchos casos poseen propiedades antimicrobianas (Pusztahelyi y col., 2015).

Entre los mecanismos de defensa constitutiva del olivo contra *V. dahliae* se encuentran la formación de tílides, pequeñas invaginaciones producidas por las células parenquimáticas adyacentes (Rodríguez-Jurado y col., 1993; Baídez y col., 2007), y la secreción de compuestos fenólicos, que se acumulan en los vasos del xilema infectados y que tras su oxidación por enzimas polifenoloxidasas, dan lugar a la coloración castaño-oscura del tejido vascular. La presencia de geles, tílides y estructuras del hongo en el xilema de la planta infectada contribuyen a la oclusión y reducción del flujo de savia bruta en el mismo, particularmente en tallo y pecíolos foliares, que junto con enzimas líticas fúngicas, fitohormonas vegetales y fitotoxinas, contribuyen al desarrollo de los síntomas de la Verticilosis (Beckman, 1981; Schnathorst, 1981).

La defensa inducible tiene dos tipos de respuesta, una Primaria, denominada PTI y otra Secundaria denominada ETI.

**Respuesta Inducible Primaria (PTI):** Cuando un microorganismo accede al interior de la planta, bien mediante penetración directa superando la primera línea defensiva, o a través de heridas o de los estomas, establece contacto con la pared celular de las células que poseen receptores (denominados PRRs) de reconocimiento de los llamados patrones moleculares asociados a patógenos ('Pathogen-Associated Molecular Patterns' o PAMPs) embebidos en la membrana citoplasmática. Éstos PAMPs están muy conservados en diferentes tipos de microorganismos, y los más estudiados son la flagelina y los lipopolisacáridos de las bacterias, la quitina de los hongos y los  $\beta$ -glucanos de hongos y oomicetos. Una vez que los PAMPs son reconocidos por esos

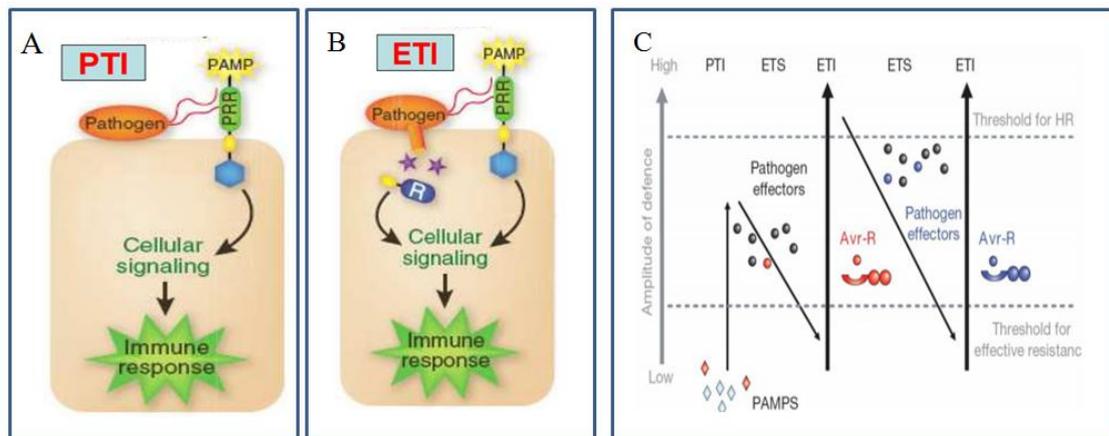
receptores se desencadena una respuesta de defensa local, poco específica, denominada PAMP-‘Triggered Immunity’ (PTI) (Fig. 4) (Chisholm y col., 2006). Los PRRs también reconocen los ‘Damage-Associate Molecular Patterns’ (DAMPs), que son compuestos generados a partir de la planta por acción de enzimas hidrolíticas de los microorganismos, como es el caso de los oligogalacturónidos (Bruce y Pickett, 2007). Sin embargo, esta respuesta defensiva local se puede extender sistémicamente a otras partes de la planta alejadas del punto de infección, estando este proceso mediado fundamentalmente por las fitohormonas SA, ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), aunque el ácido abscísico (ABA), y auxinas, citoquininas, giberelinas (GAs) y brasinoesteroides también parecen intervenir como señalizadores de estas respuestas (Pieterse y col., 2009).

La PTI es operativa en la expresión de la resistencia basal, de plantas no huésped del patógeno, pero es superada por los patógenos adaptados a éste (Tsuda y Katagiri, 2010), es decir, aquellos que han evolucionado bien con cambios que les permiten no ser reconocidos por los receptores PRR o bien secretando moléculas efectoras tales como proteínas Avr, coronatina, GAs, etc., que les permiten suprimir la PTI (Dodds y Rathjen, 2010). En este sentido, un patógeno puede producir de 20 a 30 efectores diferentes pero, a su vez, muy específicos.

**Respuesta Secundaria (ETI):** Las plantas, por su parte, también han evolucionado para contrarrestar la ineficiencia de PTI, desarrollando receptores citoplasmáticos que les permiten contrarrestar a las moléculas efectoras y desencadenar un segundo nivel defensivo: la ‘Effector-Triggered Immunity’ (ETI) (Fig. 4). Entre dichos receptores destacan por su abundancia aquellos que poseen un dominio de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio rico en repeticiones de leucina (LRR) (denominados, NBS-LRR). La ETI generalmente conlleva una respuesta de muerte celular hipersensible (HR) en el sitio de infección y suele proporcionar resistencia local efectiva contra los patógenos biotrofos y hemibiotrofos (Glazebrook, 2005). Sin embargo, también se ha observado, en contra de lo que se creía, que PAMPs como la flagelina y el péptido bacteriano flg22 son capaces de inducir HR (Naito y col., 2008).

Ya que tanto microorganismos como plantas poseen múltiples efectores y receptores, respectivamente, la ETI se activa y reprime sucesivas veces siguiendo un modelo en ‘zig-zag’ (Fig. 4) (Jones y Dangl, 2006), y la amplitud final de la respuesta de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad será proporcional a la ecuación  $PTI - ETS + ETI$ . Actualmente, se cuestiona que PTI y ETI sean respuestas de defensa diferentes ya que ambas provocan cambios similares en el sitio de infección del patógeno (Pitzschke y col., 2009): alcalinización del medio, apertura de canales iónicos, producción de estreses oxidativo y nitrosativo (Mur y col., 2013), activación de proteínas quinasas activadas por el mitógeno (MAPKs), reprogramación de la expresión de genes y reforzamiento de la pared celular mediante la acumulación de depósitos de calosa y lignina (Alonso-Ramírez y col., 2014), aunque la ETI es cualitativamente más fuerte y más rápida; de hecho, se ha propuesto que la PTI es la versión débil de la ETI (Thomma y col., 2011).

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



**Figura 4.** Respuestas defensivas de la planta: A) de tipo PTI (PAMP-‘Triggered Immunity’) (Pieterse y col, 2009) y B) de tipo ETI (‘Effector-Triggered Immunity’) (Pieterse y col, 2009). C) Modelo de las respuestas de defensa de la planta en ‘zig-zag’ propuesto por Jones y Dangl (2006).

### 3.2. Redes de señalización de defensa en planta

En el proceso de defensa de las plantas contra las enfermedades es fundamental el balance entre todas las fitohormonas, que se logra mediante un complejo sistema de interacción (‘cross-talk’) hormonal, y que, a su vez, está equilibrado con el crecimiento vegetal. La importancia de SA, JA y ET como señales primarias en la regulación del sistema inmune de la planta está bien establecida (Pieterse y col., 2009) (Fig. 5).

Los patógenos biotrofos son generalmente sensibles a las respuestas reguladas por SA, el cual se requiere tanto para la resistencia local como para la sistémica, esta última conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR). Por el contrario, los patógenos necrotrofos suelen sucumbir a las defensas controladas por JA y ET, que actúan como señales primarias de una respuesta sistémica denominada resistencia sistémica inducida (ISR). Esta última requiere la proteína NPR1 (‘non-expressor of PR genes 1’), un regulador clave en la señalización de SA.

Las fitohormonas permiten a la planta establecer un balance entre procesos defensivos y procesos de desarrollo. Con frecuencia, las plantas están sometidas a la invasión de múltiples patógenos y microorganismos beneficiosos que pueden influir en

la inducción de sus respuestas de defensa, la activación de diferentes mecanismos de defensa implicaría unos costes energéticos demasiado elevados para las mismas. Está bien documentado que los cambios moleculares que aumentan los niveles de SA reducen las defensas de respuesta a JA, y que el bloqueo de genes de respuesta a SA incrementa la expresión de genes inducidos por JA (Spoel y col., 2003; Koornneef y Pieterse, 2008; León-Reyes y col., 2009). El efecto antagónico JA-SA depende fundamentalmente de la proteína NPR1 (Fig. 5), que activa genes de defensa de respuesta a SA como *PR-I*, además de factores de transcripción como WRKY70 o GRX480 que inhiben la expresión de genes de respuesta a JA (Pieterse y col., 2009). Se han descrito varios reguladores que controlan tanto la acumulación del SA inducido por patógeno, como la acumulación basal de la hormona, y la transducción de su señal, entre ellos se encuentra la proteína EDS1 y aquellas con las que interacciona (Dempsey y col., 2011). Aunque la producción de EDS1 se ve controlada por los niveles de SA mediante un bucle de retroalimentación positiva, se ha demostrado una ruta de señalización de resistencia dependiente de EDS1 pero independiente de la presencia de SA (Venugopal y col., 2009).

La traducción de señal del JA se inicia con la unión de la hormona activa, el jasmonoil-isoleucina (Ja-Ile), a su receptor COI1 ('Coronatine Insensitive 1'). COI1 forma parte del complejo de ubiquitinación SCF (Skp, Cullin, F-box), de manera que cuando se produce la unión con la hormona, se da la interacción entre COI1 y los represores transcripcionales JAZ ('Jasmonate-ZIM domain'), ocurriendo la degradación de éstos por el proteosoma y activándose la expresión de aquellos genes de respuesta a JA que estaban reprimidos (Fig. 5). Entre ellos destaca el factor de transcripción MYC2, que a su vez regula la expresión de otros factores de transcripción y negativamente la suya propia. MYC2 es un regulador positivo de genes de respuesta a herida como *VSP* ('Vegetative Storage Protein'), y negativo de genes de respuesta a patógenos necrotrofos como *PDF1.2* (defensina) y *b-Chi* (quitinasa) (Kazan y Manners, 2013) (Fig. 5). Por otro lado, la degradación de los JAZ también permite la expresión del factor de transcripción ERF1 ('Ethylene-Response Factor 1'), que induce la expresión de genes de respuesta a necrotrofos e inhibe la de aquellos de respuesta a herida (Lorenzo y Solano, 2005).

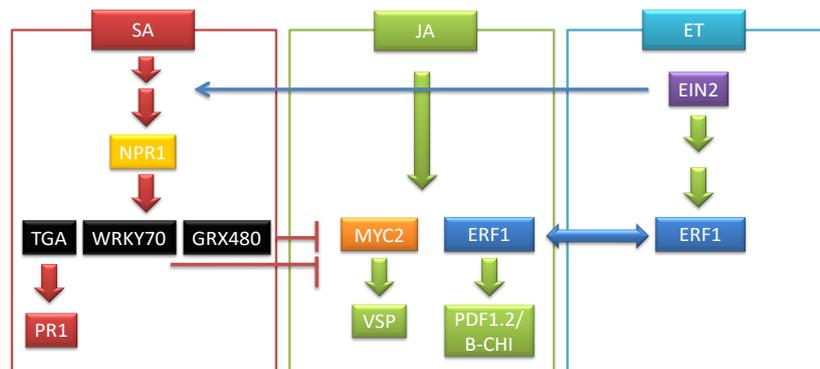
La ruta de transducción de ET, hormona gaseosa que se sintetiza de forma ubicua en las plantas a partir del precursor S-adenosil metionina, comienza con la inactivación de sus receptores -ETR1 ('Ethylene Resistant 1'), ETR2, ERS1 ('ETR related sequence 1'), ERS2 y EIN4 ('Ethylene Insensitive 4'), por la unión de la hormona a los mismos. Estas proteínas tienen una función redundante y una actividad represora sobre la cascada de señalización de ET pues activan la CTR1 ('Constitutive Triple Response 1'), una proteína represora de la ruta. En presencia de ET, CTR1 está inactiva y permite la rotura de EIN2, una proteína transmembrana del retículo endoplasmático, resultado un fragmento que pasa al núcleo y controla la actuación de factores de transcripción primarios como EIN3 que, a su vez, regulan factores de transcripción como ERF1, punto de intersección entre las rutas del JA y del ET (Fig. 5). ERF1 induce la expresión

de genes de respuesta al ET, entre los que se encuentran los genes de defensa frente a necrotrofos (Li y Guo, 2007).

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

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

Al contrario que la relación SA-JA, la interacción JA-ET es sinérgica, potenciando el ET la acción del JA a nivel de los genes de respuesta a patógenos necrotrofos debido a la existencia de un nodo común a ambas rutas, el factor de transcripción ERF1 (Fig. 5). Adicionalmente, el ET también desempeña un papel en la regulación de la ruta del SA, induciéndola a través de EIN2, y constituyendo por tanto, otro regulador del balance JA-SA (Pieterse y col., 2009).



**Figura 5.** ‘Cross-talk’ hormonal entre las fitohormonas fundamentales en la señalización de respuestas de defensa frente a estreses bióticos. La relación SA-JA tiene un papel predominantemente antagonístico que tiene lugar a través de las proteínas WRKY70 y GRX480. En esta interacción el ET también desempeña una función balanceadora, ya que potencia la ruta del SA por la proteína EIN2. La relación ET-JA es sinérgica debido al factor de transcripción común ERF1 (adaptado de Pieterse y col., 2009).

Las relaciones beneficiosas entre las plantas y los microorganismos suelen ocurrir en la rizosfera y ayudan a la planta a superar los estreses bióticos o abióticos (Hermosa y col., 2012, 2013; Zamioudis y Pieterse, 2012). La raíz responde a diferentes

‘Microorganism-Associated Molecular Patterns’ (MAMPs), y los microorganismos beneficiosos [rhizobia, hongos micorrícicos, rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) y hongos promotores del crecimiento (PGPF)], señalizan una defensa MAMP-‘Triggered Immunity’ (MTI), similar a la PTI descrita anteriormente.

Los estudios sobre señalización de defensa en olivo son muy escasos. Se ha publicado que la colonización de la raíz de olivo por la cepa endofita *P. fluorescens* PICF7, un ACB contra la VO causada por el patotipo D de *V. dahliae*, induce respuestas de defensa en la raíz de la planta, incluyendo genes relacionados con SAR e ISR (Schilirò y col., 2012). De hecho, la colonización de plantas “Arbequina” con este ACB produjo la expresión diferencial de genes implicados en la biosíntesis de fitohormonas, fenilpropanoides y proteínas PR, así como la sobreexpresión de factores de transcripción relacionados con respuestas de defensa sistémica (Schilirò y col., 2012). Posteriormente, se demostró que la colonización de la raíz de olivo con PICF7 es capaz de producir un amplio abanico de respuestas de defensa sistemática, ya que los cambios de expresión de genes de defensa se detectan también en los tejidos de la parte aérea del olivo (Gómez-Lama Cabanás y col., 2014). Recientemente, utilizando variedades con distinta susceptibilidad a la VO, se ha observado una relación entre la expresión de los genes *GRASI* (‘caffeoyl-O-Methyl transferase’) y *DRR2* (‘disease resistance-responsive protein’) y la tolerancia a la VO, y se ha sugerido que los niveles de estos transcritos podría utilizarse como un marcador de tolerancia de los cultivares de olivo a *V. dahliae* (Gómez-Lama Cabanás y col., 2015).

#### 4. *TRICHODERMA* SPP.

##### 4.1. Morfología y sistemática

El género *Trichoderma* agrupa hongos filamentosos anamórficos (mitóspóricos) pertenecientes a la División Deuteromicota, y a su vez a la clase de los Hifomicetos (Gams y col., 1987). Se reproducen de forma asexual alternando la formación de micelio y esporas (conidias), éstas últimas formadas a partir de células desnudas (Webster, 1980). No obstante, en algunos aislamientos se ha descrito el estado perfecto, sexual o teleomórfico (meiótico) dentro del género *Hypocrea*, mientras que el estado asexual (anamórfico o mitóspórico) se denomina *Trichoderma*; así, se han identificado *Hypocrea virens* como el teleomorfo de *Trichoderma virens* (Chaverri y col., 2001), *Hypocrea atroviridis* el de *Trichoderma atroviride* (Dodd y col., 2003) e *Hypocrea lixii* el de *Trichoderma harzianum* (Chaverri y col., 2003). En el año 1996, un estudio molecular demostró que las especies del género *Trichoderma* son derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar su ciclo sexual (Kuhls y col., 1996).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y producen grandes cantidades de conidias, generalmente

verdes, o excepcionalmente hialinas, formadas a partir de células conidiógenas enteroblásticas fialídicas (Kirk y col., 2001). Los conidióforos de *Trichoderma* son muy ramificados (asemejándose a arbustos con forma piramidal), están tabicados y sus células contienen más de un núcleo. Las conidias son ovoides, con pared normalmente lisa y con un solo núcleo. Bajo determinadas condiciones de estrés, en el micelio se diferencian clamidosporas, unas mitosporas capaces de resistir condiciones ambientales desfavorables. Estas estructuras son globosas, con pared rugosa y más gruesa que la de las conidias, y tiene gran importancia en la supervivencia del hongo (Lewis y Papavizas, 1984). El número de cromosomas por núcleo varía de tres a siete (Goldman y col., 1998) y varía también el tamaño del genoma, aproximadamente entre 34 y 39 Mpb (Martínez y col., 2008; Kubicek y col., 2011).

El género *Trichoderma* se describió hace 220 años (Persoon, 1794). Sin embargo, debido a la similitud de sus especies, la taxonomía basada en criterios morfológicos (Rifai, 1969; Bissett, 1991) fue ardua hasta la disponibilidad de las técnicas moleculares. En la última década, la utilización de secuencias de las regiones ITS ('Internal Transcribed Spacers') y de genes que codifican el factor de elongación de la transcripción  $1\alpha$  (*tef1 $\alpha$* ) o la endoquitinasa 42 (*ech42*) han permitido establecer taxones moleculares en el género (Kubicek y col., 2003), describir especies como *T. asperellum* o *Trichoderma parareesei* (Lieckfeldt y col., 1999; Atanasova y col., 2010), relacionar especies con fase sexual (Chaverri y col., 2003), o distinguir aquellas formas patogénicas de hongos cultivados, como el champiñón (Hermosa y col., 2000).

En la actualidad, el género está dividido en 16 clados que se agrupan en seis secciones: TRICHODERMA, PACHYBASYUM, LONGIBRACHIATUM, SATURNISPORUM, HYPOCREARUM y BREVICOMPACTUM (Druzhinina y col., 2011), y son reconocidas, por la Subcomisión Internacional de *Trichoderma/Hypocrea*, más de 200 especies (<http://www.isth.info/biodiversity/index.php>) (Atanasova, 2014).

## 4.2. Ecología

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

Estos hongos habitantes del suelo, en principio, degradadores de materia orgánica muerta, también actúan como micoparásitos. Un análisis comparativo de los genomas de *Trichoderma reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* ha demostrado que el micoparasitismo es la forma de vida ancestral del género *Trichoderma* y que, posteriormente, surgió la colonización de la rizosfera, hecho que se habría visto favorecido por la presencia en el

suelo de patógenos y exudados de la raíz de las plantas (Kubicek y col., 2011). Varios estudios han mostrado que la colonización de la raíz por *Trichoderma* se limita a los espacios intercelulares sin alcanzar los vasos (Yedidia y col., 1999; Chacón y col., 2007; Samolski y col., 2012), y que el hongo se beneficia de los exudados de las raíces de la planta y de la protección del nicho a colonizar (Woo y Lorito, 2006; Rubio y col., 2012). Además, algunas de las especies de *Trichoderma* tienen como hábitat tejidos de las plantas, donde se desarrollan como endófitas sin causar daños aparentes (Bailey y col., 2006, 2008; Bae y col., 2009).

Otro aspecto a destacar es la resistencia relativa de varias especies de *Trichoderma* a fungicidas de tipo bencimidazol (Mukherjee y col., 2003), muy utilizados en agricultura. Esta condición, junto con su velocidad de crecimiento y su fácil adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas confieren a *Trichoderma* ventaja sobre otros muchos hongos filamentosos en la colonización de suelos tras la aplicación de estos tratamientos, y hacen de estos hongos unos excelentes candidatos a ACBs.

### **4.3. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico**

El control biológico es el uso de organismos beneficiosos para reducir los efectos negativos producidos por agentes fitopatógenos y para promover respuestas positivas en las plantas. El biocontrol no solo se limita a controlar las enfermedades de las plantas, sino que también se relaciona con los beneficios directos que algunos microorganismos ejercen sobre las mismas (Shoresh y col., 2010).

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

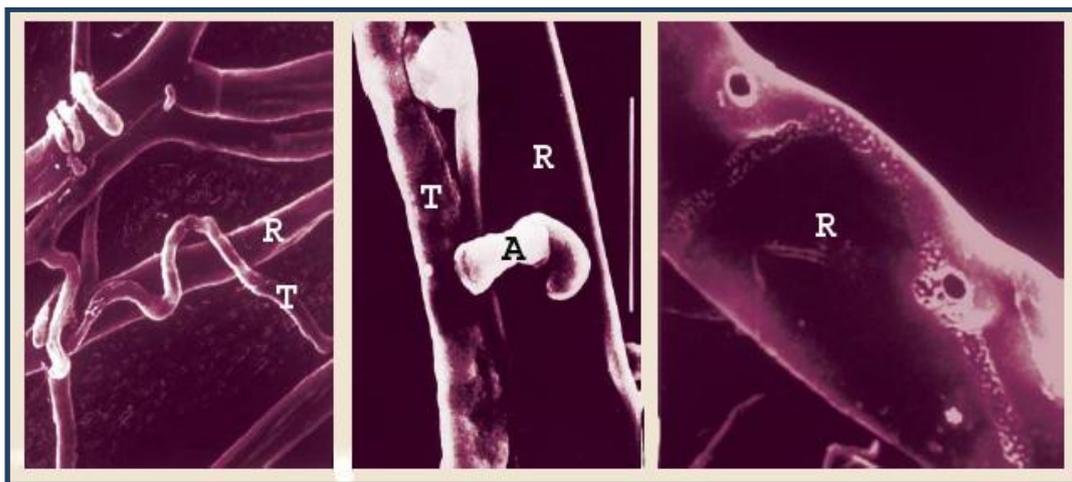
#### **4.3.1. Micoparasitismo**

El micoparasitismo es el tipo de simbiosis en la que un hongo parásito se beneficia de otro, el huésped, del que obtiene los nutrientes necesarios para completar su crecimiento y reproducción pudiéndole causar perjuicio o incluso la muerte. Cuando ocurre esto último el parasitismo se denomina necrotrofo para diferenciarlo del parasitismo biotrofo, en el que la interacción solo puede tener lugar con las células vivas del huésped.

El micoparasitismo producido por *Trichoderma* spp. es un proceso complejo que conlleva una serie de eventos secuenciales (Fig. 6). Primero, la especie de *Trichoderma* localiza al patógeno y crece orientado hacia él por quimiotropismo (Lu y col., 2004). Esta detección a distancia se debe, al menos parcialmente, a la expresión secuencial de CWDEs. Aunque las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden seguir distintos patrones

de inducción de CWDEs, parece seguro que una exoquitinasa extracelular, producida de forma constitutiva a bajos niveles, podría estar implicada en este proceso. Esta exoquitinasa determina la liberación de ciertos oligómeros de la pared del hongo diana, que inducen la expresión de genes que codifican endoquitinasas (Brunner y col., 2003; Harman, 2006), cuya liberación y difusión determinan que *Trichoderma* comience el ataque al hongo diana antes de que se haya producido el contacto físico (Viterbo y col., 2002).

Una vez que los hongos parásito y huésped establecen contacto, las hifas de *Trichoderma* pueden enroscarse alrededor de la hifa de su presa y formar estructuras especializadas de tipo apresorio (Fig. 6), desde las que se produce la penetración en el interior de las hifas del patógeno. Esta unión parece estar mediada por la interacción entre carbohidratos (generalmente galactosa o fucosa) de la pared celular de *Trichoderma* y lectinas del hongo diana (Inbar y Chet, 1996; Rocha-Ramírez y col., 2002; Reithner y col., 2005; Zeilinger y col., 2005). Una vez en contacto, *Trichoderma* produce varias CWDEs y antibióticos como los peptaiboles que producirían poros en la pared celular del hongo parasitado (Schirmböck y col., 1994; Mukherjee y col., 2011).



**Figura 6.** *Trichoderma* parasitando al hongo *Rhizoctonia solani*. En la foto de la izquierda, *Trichoderma* parasita una hifa de *R. solani*, se observa una reacción de enroscamiento típico de esta interacción. La foto del centro muestra una ampliación de la interacción *Trichoderma-Rhizoctonia* en la que pueden observarse las estructuras tipo apresorio. La barra equivale a 10  $\mu$ m. En la foto de la derecha, la hifa de *R. solani* de la que se ha retirado la hifa de *Trichoderma* muestra los poros provocados por el micoparásito en algunos puntos de unión entre ambas hifas. R: hifa de *R. solani*. T: hifas de *Trichoderma* spp. A: estructuras de tipo apresorio (tomado de Harman y col., 2004).

Finalmente, *Trichoderma* digiere el contenido intracelular del hongo, fase que va acompañada de algunos cambios morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del huésped (Benhamou y Chet, 1996) (Fig. 6). En algunos casos, también se ha observado la esporulación de *Trichoderma* tras la completa digestión del hongo atacado (Elad y col., 1984).

El mecanismo micoparasítico de *Trichoderma* implica la acción de diversas CWDEs, entre las que destacan quitinasas, glucanasas y proteasas (Sanz y col., 2004).

### **Quitinasas**

La quitina, homopolímero de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (NAG) con uniones  $\beta$ -1,4, es uno de los polímeros más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y forma parte del exoesqueleto de insectos, de la cubierta de crustáceos y de huevos de nematodos y de la pared celular de hongos (Li, 2006). La hidrólisis enzimática de la quitina es catalizada por un sistema quitinolítico que comprende endo y exoquitinasas (EC 3.2.1.14). De acuerdo con la clasificación CAZy ('Carbohydrate Active Enzymes' database, <http://www.cazy.org/>), el sistema quitinolítico pertenece a la familia 18 de las glicosil hidrolasas (GH18) y N-acetil- $\beta$ -hexosaminidas (E.C. 3.3.1.52), miembros de la familia 20 de las glicosil hidrolasas (GH20). Las endoquitinasas rompen aleatoriamente los enlaces glicosílicos a lo largo de la cadena de quitina y las exoquitinasas rompen progresivamente dos unidades de extremos reducidos y no reducidos de la cadena de quitina. Las subunidades rotas pueden ser, a su vez, convertidas en monómeros de N-acetil-D-hexosaminas. Además, la quitina puede ser parcialmente deacetilada a quitosano por acción de las quitinadeacetilasas (E.C. 3.5.1.41), las cuales, están clasificadas dentro de la familia 4 de las carbohidrato esterasas (Grover, 2012; Gruber y Seidl-Seiboth, 2012).

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

### **Glucanasas**

Las glucanasas comprenden un gran número de enzimas que degradan homopolímeros lineales o ramificados de D-glucosa unidos mediante enlaces  $\alpha$  y/o  $\beta$ . Las glucanasas se clasifican según el tipo de enlace sobre el que actúan y su modo de

acción. Las más estudiadas en *Trichoderma* corresponden al grupo de las  $\beta$ -1,4-glucanasas o celulasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y  $\beta$ -1,6-glucanasas, aunque también se han descrito otras como las  $\alpha$ -1,3-glucanasas. Se han purificado numerosas  $\beta$ -1,3-glucanasas de *Trichoderma* que, en ensayos *in vitro*, han demostrado inhibir el crecimiento o la germinación de distintos hongos (de la Cruz y col., 1995b; El-Katatny y col., 2001). Las  $\beta$ -1,6-glucanasas se han relacionado directamente con el micoparasitismo, ya que transformantes que sobreexpresan algunos de los genes que codifican enzimas con esa actividad tienen mayor actividad antifúngica que la cepa silvestre contra patógenos como *R. solani* y *Botrytis cinerea* (de la Cruz y col., 1995a; Montero y col., 2005, 2007). Recientemente, estudios transcriptómicos mediante ‘microarrays’ y secuenciación de ARN (ARN-seq) han demostrado que las glucanasas tienen un papel fundamental en el micoparasitismo de *Trichoderma* (Atanasova y col., 2013; Steindorff y col., 2014).

### **Proteasas**

Las proteasas, gracias a su naturaleza tan diversa, participan en una gran variedad de procesos fisiológicos en el hongo como morfogénesis, nutrición, metabolismo o procesamiento de proteínas extracelulares (Howell, 2003). PRB1 fue la primera proteasa descrita en *Trichoderma*, una serín proteasa básica aislada y caracterizada en *T. harzianum* (Geremía y col., 1993). La incorporación de transformantes de *T. harzianum* que sobreexpresan el gen *prb1* a suelos infestados por *R. solani* reducía significativamente la enfermedad causada por este patógeno en plantas de algodón (Flores y col., 1997). Una serín proteasa de *T. harzianum* T34, PRA1, con efecto nematocida, se ha relacionado, por su patrón de expresión, con el micoparasitismo del hongo (Suárez y col., 2004). En estudios transcriptómicos (Seidl y col., 2009; Atanasova y col., 2013; Steindorff y col., 2014), las proteasas también han demostrado jugar un papel importante en el micoparasitismo de *Trichoderma* y, particularmente, las proteasas aspárticas (Atanasova y col., 2013).

Recientemente, la obtención de mutantes del gen *nmp1* ha permitido demostrar que la metaloproteasa NMP1 de *Trichoderma guizhouense* está implicada en las interacciones biotróficas, tales como micoparasitismo y depredación, y en la defensa de este microorganismo frente a otros hongos. Es de destacar que la expresión de este gen es diferente si el hongo se enfrenta al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* o lo hace a biomasa muerta del mismo (Zhang y col., 2016).

### **4.3.2. Antibiosis**

La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por los metabolitos secundarios (SMs) producidos por otro, sin que medie contacto físico entre ellos. Los SMs son moléculas que no esenciales para el crecimiento del organismo pero tienen un importante papel en señalización, desarrollo e interacción con otros organismos (Keller y col., 2005; Hoffmeister y Keller, 2007; Osbourn, 2010), y son

frecuentemente sintetizados cuando se detiene el crecimiento activo o bajo determinadas condiciones de cultivo, generalmente relacionadas con situaciones de estrés (Keller y col., 2005). *Trichoderma* spp. representa una de las más grandes diversidades metabólicas encontradas dentro del reino Fungi. Se ha descrito que es capaz de producir miles de compuestos distribuidos en más de 120 estructuras de SMs (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Degenkolb y col., 2008; Reino y col., 2008; Vinale y col., 2012). Entre ellos, los más estudiados son los peptaiboles (ejemplo: trichokoninas y alametacina), pequeños péptidos no ribosómicos (NRPs) (ejemplo: gliotoxina y sideróforos), policétidos (PKs) (ejemplo: aspinolidas y trichodermacetonas), terpenos (trichotecenos) y pironas (ejemplo: 6-pentil- $\alpha$ -pirona, 6-PP) (Mukherjee y col., 2013; Hermosa y col., 2014).

Algunos SMs de *Trichoderma* han mostrado múltiples aplicaciones en terapia humana como anticancerígenos, supresores de inmunidad o agentes reductores de colesterol (Keswani y col., 2014). También se ha observado actividad antimicrobiana de algunos SMs contra patógenos humanos, bacterias, levaduras y hongos filamentosos del género *Aspergillus* (Vizcaíno y col., 2005; Tijerino y col., 2011; Leelavathi y col., 2014); e incluso se ha descrito potencial entomopatígeno para algunos SMs (Vargas y col., 2014; Ganassi y col., 2016).

Estudios de genómica comparada han revelado que *T. atroviride* y *T. virens* poseen un repertorio de genes que codifican NRP sintasas y PK sintasas superior al de cualquier otro hongo filamentosos (Kubicek y col., 2011; Mukherjee y col., 2012). Se ha observado, en ensayo *in vitro*, que algunos SMs de *Trichoderma* poseen actividad antimicrobiana contra patógenos de interés agrícola pertenecientes a géneros tan diversos como *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Stachybotrys*, *Colletotrichum*, *Aspergillus* o *Gaeumannomyces*. Recientemente, la obtención de mutantes de *T. parareesei* silenciados en *Tparo7*, gen que codifica la corismato mutasa (enzima de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos), ha demostrado que los metabolitos tirosol, 2-feniletanol y SA, se forman en esta ruta y contribuyen a la actividad antifúngica del hongo (Pérez y col., 2015).

En los últimos años, como se detallará más adelante, muchos SMs de *Trichoderma* han mostrado capacidad para inducir respuestas de defensa en plantas y/o promover su crecimiento (Viterbo y col., 2007; Mukherjee y col., 2012; Vinale y col., 2012, Malmierca y col., 2015a; Garnica-Vergara y col., 2016). Sin embargo, pocos de esos SMs han demostrado capacidad para contribuir por si solos al control de una determinada enfermedad bajo condiciones de campo (Keswani y col., 2014; Li y col., 2014).

### 4.3.3. Competencia con el patógeno

Se entiende por competencia el desigual comportamiento de dos o más organismos por un mismo requerimiento o recurso, de manera que la utilización de éste por uno de

ellos reduce la cantidad disponible para los demás. Estos requerimientos o recursos pueden ser nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz, etc. (Paulitz, 1990).

Es difícil determinar hasta qué punto *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista solo a través de la competición o si, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competición se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman, 2006). Aún así, existen varios ejemplos en los que la captación de nutrientes es el mecanismo de competición directo de *Trichoderma* frente algunos patógenos (Howell y Stipanovic, 1995; Handelsman y Stabb, 1996; Lo y col., 1996).

La competición por carbono, nitrógeno y hierro juega un papel importante durante la interacción entre hongos beneficiosos y perjudiciales. *Trichoderma* spp. es capaz de movilizar y absorber nutrientes del suelo más eficientemente que otros hongo (Vinale y col., 2008). También se ha relacionado la mayor capacidad de *T. asperellum* para movilizar hierro con su mayor capacidad para combatir enfermedades causadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (Segarra y col., 2010).

#### **4.4. Efectos beneficiosos en la planta**

##### **4.4.1. Promoción del crecimiento**

Las especies de *Trichoderma* son capaces de promover el crecimiento y el desarrollo de las raíces laterales de las plantas (Chang y col., 1986; Yedidia y col., 2001), con el consiguiente incremento de la productividad en los cultivos (Harman y col., 2004, 2006). Para explicar este hecho se han sugerido varios mecanismos como son: la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores, o la conversión de material no utilizable (metales como hierro, zinc, manganeso y cobre) en formas que puedan ser utilizadas por las plantas (Altomare y col., 1999). Sin embargo, no todas las especies y/o cepas de *Trichoderma* estimulan el desarrollo de las plantas (Hermosa y col., 2012). Este hecho está condicionado por el genotipo de la planta (Tucci y col., 2011) y por la especie de *Trichoderma* en cuestión (Rubio y col., 2012). De hecho, algunas especies de *Trichoderma* causan efectos negativos sobre el crecimiento de la planta, como es el caso de *Trichoderma brevicompactum*, cuyos efectos adversos se han asociado con una producción de trichodermina (Tijerino y col., 2011).

Trabajos llevados a cabo con mutantes de plantas y/o transformantes de *Trichoderma* spp. han demostrado que algunas especies pueden producir ácido indol acético (IAA), provocando la regulación de los niveles de esta hormona en la rizosfera (Contreras-Cornejo y col., 2009; Hoyos-Carvajal y col., 2009); incrementar la capacidad fotosintética de las plantas (Vargas y col., 2009); o modificar la arquitectura de la raíz, aumentando el número de raíces secundarias y pelos radicales, para aumentar la toma de nutrientes (Samolski y col., 2012). Además, su capacidad para reducir la disponibilidad de ET en las plantas, promueve el crecimiento de las mismas, ya que disminuye los

niveles de su molécula precursora mediante la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa o ACCD desaminasa (Viterbo y col., 2010). En este mismo sentido, SMs purificados de algunas cepas de *Trichoderma* como 6-PP, koningina, harzianopiridona, cerinolactona, aspinolidas o ácido harziánico, así como mutantes afectados en la producción de pironas como 6-PP y trichotecenos como harzianum A (HA), han demostrado que estos compuestos son capaces de promover el crecimiento de plantas como tomate, arábidopsis, trigo, guisante, azalea, etc. (Vinale y col., 2008, 2012; Malmierca y col., 2012, 2013, 2015a; Garnica-Vergara y col., 2016; Mutawila y col., 2016). Parece que en esas respuestas de la planta a *Trichoderma* spp. se engloban componentes del transporte y señalización de auxinas, además de EIN2 (Garnica-Vergara y col., 2016).

#### 4.4.2. Incremento de las defensas contra estreses bióticos

Durante muchos años, la capacidad de distintas cepas de especies de *Trichoderma* spp. para proteger a la planta contra patógenos de raíz se atribuyó a un efecto directo sobre el patógeno (Chet y col., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que, al colonizar las raíces de la planta, dichas cepas estimulan los mecanismos de defensa de la misma (Yedidia y col., 1999; Korolev y col., 2008; Segarra y col., 2009; Hermosa y col., 2012, 2013) (Fig. 7), lo que conlleva a un incremento de su resistencia contra a varios microorganismos fitopatógenos e incluso nematodos (Monte, 2001; Harman y col., 2004).

Está demostrado que *Trichoderma* spp. inicialmente coloniza la superficie de las raíces de la planta para, posteriormente, penetrar en las primeras capas de células de la epidermis (Yedidia y col., 1999; Chacón y col., 2007), donde permanece como un microorganismo simbiote no patogénico (Harman y col., 2004; Woo y col., 2006), induciendo cambios en la arquitectura de la raíz (Samolski y col., 2012) y otros cambios sistémicos que influyen sobre su capacidad de defensa contra patógenos y estreses abióticos (Hermosa y col., 2012, 2013). También se ha demostrado que además de los depósitos de calosa que se acumulan en la raíz ante la presencia de microorganismo del suelo, la producción de SA por la planta juega un papel determinante en confinar a *Trichoderma* en el espacio apoplástico impidiendo su entrada en el sistema vascular (Alonso-Ramírez y col., 2014). Además, mediante estudios transcriptómicos, se ha observado que en las primeras horas de interacción de *Trichoderma* spp. con la planta tiene lugar, en ésta, una bajada en la expresión de genes de defensa relacionados con las rutas de señalización de SA y JA, hecho que permitiría a *Trichoderma* colonizar la raíz (Morán-Diez y col., 2012).

A su vez, en el establecimiento de la interacción con la planta, *Trichoderma* spp. producen una gran variedad de MAPMs y algunos DAMPs, como la endopoligalacturonasa ThPG1 (Morán-Diez y col., 2009), que activan la MTI (Hermosa y col., 2012). Entre los MAMPs que se han identificado hay desde xilanasas (Rotblat y col., 2002) y celulasas (Martínez y col., 2001) hasta ceratoplataninas (Djonovic y col.,

2006; Seidl y col., 2006), e incluso metabolitos secundarios como 6PP y otros que, a bajas dosis, pueden actuar como MAMPs (Vinale y col., 2008, 2012; Garnica-Vergara y col., 2016).

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

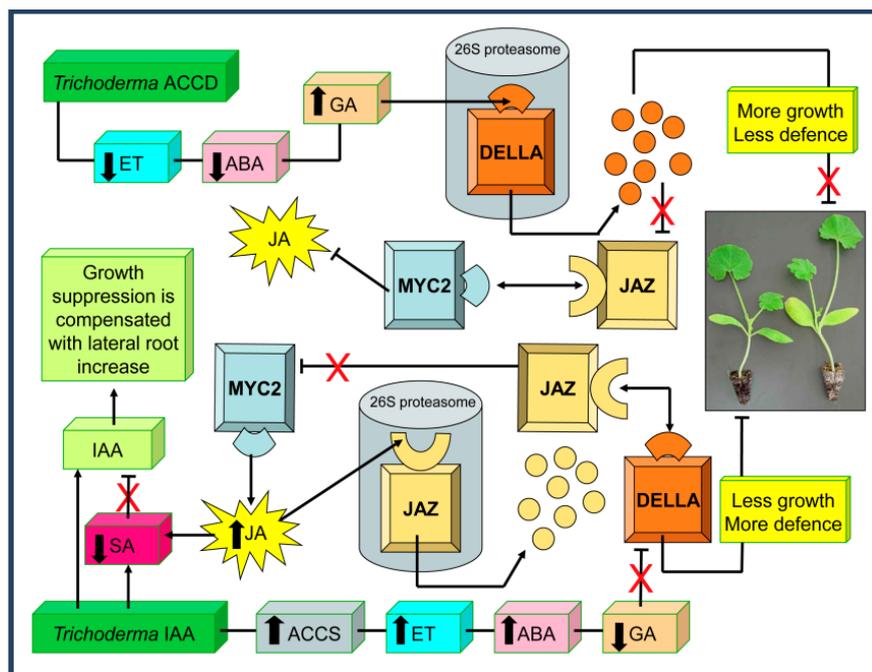
Las respuestas de la planta a la colonización por *Trichoderma* spp. incluyen la secreción de peroxidasas (Howell y col., 2000), la biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell, 2006), y la modificación de los niveles de JA, SA y ET (Harman y col., 2004; Lorito y col., 2010; Hermosa y col., 2013). Aunque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

Por otro lado, y de forma similar a lo que ocurre con los fitopatógenos, *Trichoderma* spp., pueden producir efectores que activan una respuesta ETI en la planta, pero en este caso de tipo ‘priming’ (i.e., de predisposición). Varios trabajos han demostrado la existencia de ‘priming’ por *Trichoderma* en ausencia de patógeno, es decir, predisponer a la planta para responder de forma más rápida y más intensa frente a un ataque posterior de un patógeno (Shoreh y col., 2005; Djonovic y col., 2007; Segarra y col., 2007; Tucci y col., 2011; Malmierca y col., 2012, 2015a). En este sentido, en *T. harzianum* y *T. atroviride* se han identificado proteínas homólogas a los efectores Avr4 y Avr9 de *C. fulvum* (Harman y col., 2004), y se han descrito receptores NBS-LRR en plantas de judía en interacción con *T. atroviride* y en plantas de maíz en interacción con *T. harzianum* (Marra y col., 2006; Shoreh y Harman, 2008). Por tanto, las respuestas defensivas provocadas por *Trichoderma* spp. en la planta parecen cumplir también un modelo de ‘zig-zag’ (Lorito y col., 2010).

Al contrario de los fitopatógenos, que activan la SAR señalizada por SA y asociada con un incremento en la expresión de genes PR en la planta, *Trichoderma*, al igual que otros hongos y bacterias beneficiosos, generalmente activa la ISR que culmina en la acumulación de compuestos asociados a las rutas de JA y ET como son la fenilamonio liasa y la peroxidasa (Shoreh y col., 2005). Sin embargo, también se han descrito respuestas de tipo SAR inducidas por *Trichoderma longibrachiatum* (Martínez y col., 2001), *T. virens* (Howell, 2006), *T. asperellum* (Segarra y col., 2007) y *T. harzianum* (Morán-Diez y col., 2009). Y además, se ha confirmado que plantas tratadas con *Trichoderma* spp. pueden desencadenar la respuesta SAR durante largos periodos de tiempo pero que, cuando son posteriormente infectadas por un patógeno, pueden inducir genes de la ruta del JA que dan lugar a la represión de genes del patógeno y que

desencadenan una respuesta ISR prolongada en el tiempo (Tucci y col., 2011; Malmierca y col., 2012, 2013, 2015a). Por tanto, la separación de respuestas ISR y SAR no parece estar claramente delimitada.

La interacción entre *Trichoderma* spp. y la planta es un proceso dinámico en el que según la cepa de aquellas, la concentración de inóculo aplicada, el tipo de material vegetal, el estado de desarrollo de la planta y el momento y duración de la interacción, se pueden solapar la expresión de genes señalizados por las rutas de JA/ET y/o SA (Hermosa y col., 2012) (Fig. 7). Además, ese diálogo no se puede separar de las respuestas defensivas de la planta contra estreses medioambientales, formando un red interconectada en la que fitohormonas como IAA, ABA y GAs desempeñan también un papel importante (Pieterse y col., 2009; Hermosa y col., 2013). Y, estudios transcriptómicos han demostrado también que *Trichoderma* spp. inducen de forma activa cambios sistémicos en la fisiología de la planta, modulando la expresión de genes relacionados con estreses bióticos y abióticos (Alfano y col., 2007; Morán-Díez y col., 2012).



**Figura 7.** Modelo hipotético de interacción fitohormonal *Trichoderma*-planta. El descenso en la cantidad de etileno (ET), provocado por acción de la ACC-deaminasa del hongo, y la producción de ácido indolacético (IAA), producen cambios en la red hormonal de la planta que determinan el equilibrio crecimiento/defensa de la misma. ABA: ácido abscísico, GA: giberelinas, JA: ácido jasmónico, ACCD: 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminasa, ACCS: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa, MYC2: factor de transcripción de genes de respuesta a JA, DELLA: reguladores negativos de la señalización de GA, y JAZ: proteínas 'jasmonate ZIM domain', reguladores negativos de la señalización de JA (tomada de Hermosa y col., 2013).

El ‘cross-talk’ entre la señalización GA-JA y el balance DELLA-JAZ, regulado por MYC, son elementos clave que interrelacionan el crecimiento y las respuestas defensivas en la planta (Kazan y Manners, 2012, 2013). En *Trichoderma* spp., como se dijo anteriormente, se ha descrito la producción de IAA y el descenso en la cantidad de ET en la planta debido a la acción de la enzima ACCD que sintetiza el hongo. Según esto y las interacciones existentes entre las diferentes fitohormonas, se ha propuesto un mecanismo por el que *Trichoderma* spp. ayudarían a equilibrar las respuestas de defensa y de desarrollo en la planta (Hermosa y col., 2013) (Fig. 7). El descenso de la cantidad de ET en la planta por acción de la ACCD de *Trichoderma* se traduce en la alteración de los niveles del resto de fitohormonas. Esa reducción de ET iría acompañada de una bajada en los niveles de ABA y consecuentemente, por su efecto antagónico, de una subida de los niveles de GAs. Ello ocasionaría, una bajada en los niveles de JA que provocaría un incremento del crecimiento en perjuicio de las defensas. Por otra lado, la producción de IAA, además de favorecer el desarrollo radicular de la planta, disminuye los niveles de GA y aumenta los niveles de JA, lo cual implicaría una parada del crecimiento y una promoción de las defensas.

#### **4.4.3. Incremento de la tolerancia contra estreses abióticos**

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

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

#### **4.5. Aplicaciones de especies del género *Trichoderma***

Las especies del género *Trichoderma* poseen características que las dotan de un gran interés no solo para la agricultura, sino también para las industrias biotecnológicas (alimentaria, textil, farmacéutica y ambiental). La capacidad de algunas cepas de especies de *Trichoderma* de secretar gran cantidad de proteínas, las convierte en una alternativa como fábricas celulares para la producción de proteínas con diferentes fines biotecnológicos, y para las cuales, ya se dispone de sistemas de transformación eficaces (Cardoza y col., 2006; Steiger y col., 2011). El mejor ejemplo de especies de *Trichoderma* con interés industrial es *T. reesei/H. jecorina*, su eficiente maquinaria de

producción y secreción de celulasas ha dirigiendo su explotación comercial hacia áreas tan diversas como las fermentaciones alcohólicas, los detergentes para el lavado de ropa, el blanqueo del papel, la alimentación animal o la producción de combustible (Rosgaard y col., 2007; Seidl y col., 2008; Rahman y col., 2009; Schuster y col., 2012).

*Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. gamsii*, *T. viride* y *T. virens* son las especies más citadas respecto del biocontrol de enfermedad de plantas, ya que algunas de sus cepas se utilizan como agentes de control biológico en agricultura por su capacidad antagonista contra ascomicetos, basidiomicetos y oomicetos fitopatógenos, e incluso nematodos fitoparásitos (Monte, 2001; Lorito y col., 2010; Woo y col., 2014), y como biofertilizantes, incluyéndose alguna de estas especies en programas de manejo integrado de patógenos por el efecto sinérgico que tienen al poder ser combinadas con algunos agentes químicos lo cual permite reducir las cantidades de fungicidas y pesticidas químicos (Shtienberg y Elad, 1997; Harman y col., 2004; Jiménez-Díaz y col., 2010).

Algunas especies de *Trichoderma* se han registrado para su aplicación comercial como productos fungicidas en agricultura (Monte, 2001). En España, están registrados en el MAGRAMA dos formulados a base de *Trichoderma* spp.: TUSAL<sup>®</sup> (*T. atroviride* T11 + *T. asperellum* T25) y Bioten<sup>®</sup> (*T. asperellum* ICC012 + *T. gamsii* ICC080), este último recomendado para su uso en olivo contra la VO (Hermosa y col., 2001; Jiménez-Díaz y col., 2009).

También, las especies de *Trichoderma* se usan en la biorremediación de los suelos (Cao y col., 2008). Se ha demostrado que cepas de *T. harzianum* y *T. atroviride* son capaces de aliviar la fitotoxicidad de plantas de lechuga irrigadas con agua contaminada con arsénico (Caporale y col., 2014) y que una glicoproteína de *T. harzianum* podría tener un alto potencial biotecnológico para eliminación de fosfatos en el suelo (Souza y col., 2016). También se ha identificado a *T. harzianum* como un bioabsorbente efectivo de fluoruros para la descontaminación de aguas subterráneas (Koshle y col., 2016).

Además, las especies de *Trichoderma* pueden ser una buena fuente de genes cuya aplicación biotecnológica esté dirigida hacia la obtención de plantas transgénicas con resistencia a enfermedades o a estreses abióticos (Lorito y col., 1998; Dana y col., 2006; Montero-Barrientos y col., 2010; Nicolás y col., 2014).

## 5. “ÓMICAS”

Tras el nacimiento de la biología molecular, los investigadores intentaron resolver problemas biológicos dando función a genes y productos génicos de forma individualizada. Con esta estrategia, llamémosla reduccionista, se han descubierto numerosos principios biológicos; sin embargo, la mayoría de los productos génicos

actúan de forma conjunta y, por tanto, estos procesos son redes complejas cuyos componentes están interconectados (Ge y col., 2003).

La secuenciación del primer genoma, el del bacteriófago  $\phi$ X174, abrió la era de la genómica (Sanger y col., 1978). Posteriormente, fueron surgiendo las distintas “ómicas”, término que engloba a todas aquellas disciplinas, tecnologías y áreas de investigación dedicadas al estudio del conjunto o de la totalidad de un sistema biológico. Al añadir el sufijo “-oma”, que significa “conjunto de”, a los diferentes estudios en biología, se cubren los nuevos análisis a gran escala en los que se está enfocando la investigación actual: genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica o epigenómica. Estas nuevas tecnologías no solo tienen impacto en el estudio de los procesos biológicos, sino también abren la puerta a diagnósticos y tratamientos más precisos.

A su vez, el desarrollo de los secuenciadores automáticos de ADN ha acelerado significativamente la investigación y los descubrimientos en biología. Los secuenciadores actuales, de segunda y tercera generación, permiten realizar una secuenciación masiva a gran velocidad y buen precio, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos de secuenciación a gran escala, pudiendo establecerse la secuencia completa de ADN de muchos genomas de microorganismos, animales y plantas (Quail y col., 2012). De esta forma, el estudio de los genomas se divide en “genómica estructural” (la generación y análisis de información sobre los genes de un genoma) y “genómica funcional” (la generación y análisis de información de los productos génicos).

La mayor parte de los proyectos de genómica funcional comenzaban por la obtención y análisis de colecciones de ‘Expressed Sequence Tags’ (ESTs). Estas colecciones se obtienen a partir de clones de ADNc que se secuencian parcialmente, por lo que derivan de genes que se expresan en unas condiciones determinadas y un tiempo concreto. Las ESTs se agrupan en conjuntos de secuencias redundantes (‘contigs’) y no redundantes (unigenes) en los que cada grupo representa un gen putativo único en el genoma del organismo (Skinner y col., 2001). Ya que los hongos filamentosos constituyen la base de muchas aplicaciones biotecnológicas (desarrollo y producción de antibióticos y enzimas industriales), son muy numerosos, desde finales del siglo XX, los estudios de ESTs en ellos, de lo cual son ejemplo: *Neurospora crassa* (Nelson y col., 1997), *V. dahliae* (Neumann y Dobinson, 2003), *Metarhizium anisopliae* (Freimoser y col., 2003), *Gibberella zeae* (Trail y col., 2003) o *Aspergillus oryzae* (Maeda y col., 2004).

En el campo de la transcriptómica, el uso de ‘macroarrays’ y ‘microarrays’ ha representado una herramienta muy útil para estudiar, de forma simultánea, la expresión de cientos y miles de genes, respectivamente (Ju y col., 2009). La tecnología de los ‘microarrays’ está basada en la síntesis o fijación de sondas específicas, ‘probes’, representantes de genes, proteínas o metabolitos específicos sobre un sustrato sólido, normalmente un cristal, que permita la hibridación de ellos con la molécula diana,

‘target’, cuyo marcaje dependerá del tipo de ‘array’ (Rensink y Buell, 2005). Existen dos tipos de ‘microarrays’ de expresión: de ADNc y de oligonucleótidos (Schulze y Downward, 2001). Los ‘microarrays’ de oligonucleótidos presentan la ventaja respecto de los de ADNc de que su fabricación es rápida y más robotizada, y presentan una elevada reproducibilidad y especificidad, ya que se utilizan secuencias cortas y muchas más sondas por gen. Por el contrario, los ‘microarrays’ de oligonucleótidos requieren equipamiento más especializado, por lo que su coste es elevado, y presenta poca flexibilidad en el diseño experimental.

En los últimos años se están llevando a cabo estudios transcriptómicos mediante la secuenciación de ARN (RNA-seq) (Wang y col., 2010; Fu y col., 2011). Esta tecnología había estado restringida a la re-secuenciación de organismos con genomas de referencia disponibles (Nagalakshmi y col., 2008). Sin embargo, las mejoras en la técnica han posibilitado el desarrollo de estrategias *de novo* para la reconstrucción de transcriptomas robustos de plantas no-modelo a partir de lecturas de secuencia cortas que son ensambladas en unigenes. Por ejemplo, esta metodología se ha aplicado para analizar flavonoides y antocianinas en distintas variedades de aceituna con distintos estados de maduración, aún sin información genómica de la planta de olivo (Iaria y col., 2016).

### 5.1. “Ómicas” en *Trichoderma* spp.

En *Trichoderma* spp. se han publicado varios trabajos de genómica basados en la generación de ESTs. En *T. reesei* se han realizado estudios para identificar enzimas y reguladores implicados en la degradación de biomasa (Chambergo y col., 2002; Foreman y col., 2003; Diener y col., 2004; Arvas y col., 2006), y los realizados en *T. harzianum* han tenido por objeto identificar genes de biocontrol (Liu y Yang, 2005). En este sentido, dentro del proyecto *TrichoEST*, financiado por la Unión Europea (<http://www.trichoderma.org>), destinado a identificar genes y productos génicos de *Trichoderma* spp. con alto valor biotecnológico, se obtuvieron 8.710 ESTs de *T. harzianum* CECT2413, que generaron 3.478 secuencias únicas (Vizcaíno y col., 2006b), y 8.160 ESTs de otras cuatro cepas diferentes de *Trichoderma* spp. (Vizcaíno y col., 2007).

Además, todas estas colecciones de ESTs de *Trichoderma* spp. han servido de gran ayuda en la anotación de los genomas de *T. reesei* QM9414 (Martínez y col., 2008), *T. virens* Gv29-8 y *T. atroviride* IMI 206040 (Kubicek y col., 2011) que a su vez han sido o están siendo, útiles en la anotación de los genomas secuenciados más recientemente, como en el caso de *T. harzianum* o *T. gamsii* (Tabla 2).

La comparación de los genomas de *T. reesei*, *T. virens* y *T. atroviride* ha evidenciado que comparten entre el 78 y el 96% de los genes (Kubicek y col., 2011). Además, un análisis filogenético demostró que tanto *T. reesei* como *T. virens* son derivados de *T. atroviride*, cuya función ancestral fue la micotrofia pero que evolucionaron hasta convertirse en micoparásitos (Druzhinina y col., 2011). Sin

embargo, *T. reesei* ya no tiene esa capacidad porque habría perdido los genes específicos para ello (Kubicek y col., 2011).

**Tabla 2.** Genomas secuenciados de *Trichoderma* spp.

Cepa	Tamaño genoma (Mpb)	Modelos de genes	Referencia
<i>T. harzianum</i> CBS 226.95	40,9	14.095	JGI
<i>T. harzianum</i> T6776	39,7	11.501	Baroncelli y col. (2015)
<i>T. virens</i> Gv29-8	38,8	12.428	Kubicek y col. (2011)
<i>T. gamsii</i>	37,9	10.944	Baroncelli y col. (2016)
<i>T. asperellum</i> CBS 433.97	37,4	12.586	JGI
<i>T. hamatum</i> GD12	38,2	12.391	Studholme y col. (2013)
<i>T. atroviride</i> IMI206040	36,1	11.828 (v2.0)	Kubicek y col. (2011)
<i>T. atroviride</i> (no reference)	36,4	9.127	Shi-Kunne y col. (2015)
<i>T. citrinoviride</i> CBS 258.85	33,4	9.143 (v2.0)	JGI
<i>T. reesei</i> QM6a	33,4	9.397	Martínez y col. (2008)
<i>T. reesei</i> RUT C-30	32,6	9.852	JGI
<i>T. parareesei</i> CBS 125925	32,0	9.318	Yang y col. (2015)
<i>T. longibrachiatum</i> ATCC 18648	32,2	10.938	JGI
<i>T. longibrachiatum</i> SMF2	31,7	9.409	Xie y col. (2014)

JGI: 'Joint Genome Institute'.

La respuesta temprana de *T. harzianum* al estrés hiperosmótico se estudió empleando 'macroarrays' que contenían productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) procedentes de 2.496 ESTs de este hongo obtenidas en el proyecto *TrichoEST* (Delgado-Jarana y col., 2006). Los mismos 'macroarrays' se usaron para analizar el perfil transcriptómico de *T. harzianum* durante su interacción con raíces de plantas de tomate, observándose un aumento en la expresión de genes relacionados con procesos redox, metabolismo lipídico, detoxificación, y transporte de aminoácidos o azúcares (Chacón y col., 2007).

Los primeros 'microarrays' de *Trichoderma* se diseñaron sobre *T. reesei* y se utilizaron para estudiar la asimilación aerobia y anaerobia de la glucosa (Chambergó y col., 2002), para obtener el perfil de genes implicados en la degradación de biomasa

(Foreman y col., 2003), y para identificar los genes regulados por oxígeno (Bonaccorsi y col., 2006) en este hongo. En trabajos más recientes se han utilizado ‘microarrays’ de *Trichoderma* para analizar los cambios de expresión de genes de *T. harzianum* bajo condiciones de micoparasitismo y de interacción con plantas de tomate (Samolski y col., 2009) y para comparar los cambios transcriptómicos de diferentes cepas durante el micoparasitismo de un patógeno (Atanasova y col., 2013) y en las primeras horas de interacción con plantas de tomate (Rubio y col., 2012, 2014). Además, se han empleado ‘microarrays’ como herramientas complementarias durante los análisis de mutantes de *Trichoderma* (Montero-Barrientos y col., 2011). Por otro lado, mediante ‘chips’, también se han analizado las respuestas sistémicas de plantas de tomate y de arábidopsis a la colonización por cepas silvestres y mutantes de *Trichoderma* (Alfano y col., 2007; Morán-Diez y col., 2009, 2012; Domínguez, 2014). Y, siguiendo una aproximación de RNA-seq, se han identificado genes de micoparasitismo de *T. atroviride* en respuesta a *R. solani* (Reithner y col., 2011) y de *T. harzianum* en respuesta a *Sclerotinia sclerotiorum* (Steindorff y col., 2014).

Durante la última década, se ha aplicado la proteómica en estudios de hongos de interés biotecnológico, aunque en *Trichoderma* spp. son relativamente escasos los estudios de este tipo (Hermosa y col., 2010). Mediante estudios proteómicos se han identificado en *T. atroviride* proteínas implicadas en el metabolismo energético, transporte y tolerancia a plaguicidas (Tang y col., 2010), o factores de transcripción implicados en fotoconidiación, como es el caso de BLR-1 y BLR-2 (Sánchez-Arreguin y col., 2012). Algunos estudios de cepas eficientes en biocontrol han identificado proteínas relacionadas con su micoparasitismo sobre diferentes patógenos (Suárez y col., 2005; Yan y col., 2009; Monteiro y col., 2010). Por otro lado, trabajos proteómicos realizados sobre la interacción *Trichoderma* spp.-planta han permitido identificar en el hongo CWDEs de la planta, como celulasas y hemicelulasas, y enzimas, como la eswallenina, implicada en la colonización de raíz (Brotman y col., 2008), y también identificar promotores del hongo que responden a estímulos medioambientales en su interacción con la planta (Bailey y col., 2006). También se ha aplicado la proteómica al estudio de interacciones *Trichoderma* spp. -planta-patógeno (Marra y col., 2006), y fue en un proteoma de tres componentes donde se identificó la endopoligalacturonasa ThPG1 de *T. harzianum*, un enzima que se ha relacionado con la colonización de raíz y la inducción de defensa en planta (Morán-Diez y col., 2009).

El número y la variedad de compuestos encontrados en el metaboloma de diferentes especies y cepas de *Trichoderma* spp. es asombrosamente grande e incluye enzimas líticas, intermediarios metabólicos, hormonas y cientos de SMs con una importante función biológica (Hermosa y col., 2014). En este sentido, una caracterización completa de SMs de tipo peptaibol de *T. atroviride*, por cromatografía líquida asociada a espectroscopía de masas, permitió identificar 20 trichorzianinas y 15 nuevos compuestos denominados trichoatrokontinas (Stoppacher y col., 2008). También se han usado perfiles metabólicos de numerosas cepas pertenecientes a diferentes especies de *Trichoderma* para establecer grupos y analizar su posible correlación con

aquellas filogenias establecidas a partir de secuencias de las regiones ITS y fragmentos del gen *tef1*  $\alpha$  (Degenkolb y col., 2006).

En la actualidad, muchos estudios sobre SMs de *Trichoderma* están centrados en explorar su papel como moléculas de señalización en la comunicación de este hongo con plantas y otros microorganismos (Velázquez-Robledo y col., 2011; Malmierca y col., 2012, 2013, 2015a, 2015b; Mukherjee y col., 2012; Vargas y col., 2014; Pérez y col., 2015; Bae y col., 2016; Garnica-Vergara y col., 2016). Todos estos trabajos parten de la obtención de mutantes que estén afectados en algún paso de alguna ruta biosintética de SMs del hongo, la dificultad radica en que muchos de estos caminos están todavía por describir.

Mucho menos numerosos son los estudios epigenéticos en *Trichoderma*. Un trabajo sobre regulación llevado a cabo en *T. reesei* muestra que la metiltransferasa LAE1 controla la expresión de genes de celulasas y hemicelulasas, sin embargo, mediante inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación ('ChIP-Seq'), se estableció que la expresión de *lae1* no guarda correlación con la metilación de H3K4 o H3K9 en el *loci* de celulasas y hemicelulasas (Seiboth y col., 2012).

## **6. ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA EN *Trichoderma* spp.**

Una estrategia para determinar la función biológica de una proteína es examinar el fenotipo de organismos que contienen mutaciones en el gen codificante para la misma. Una vía de estudio puede ser aislar mutantes nulos mediante el escrutinio de una colección previamente obtenida por mutagénesis o, si es posible, mediante la interrupción del *locus* de interés utilizando 'cassettes' apropiados, mostrándose esta última aproximación como la más útil y efectiva. Sin embargo, existen muchos organismos en los que esta técnica no constituye una herramienta eficaz, ya que depende directamente de la frecuencia de recombinación homóloga propia de cada sistema. *Trichoderma* spp. presentan uno de los casos en los que la frecuencia de recombinación homóloga es baja (alrededor del 2% en *T. reesei* y muy inferior en *T. harzianum*) aunque varía según la cepa de dichas especies (Mach y Zeilinger, 1998). Se han descrito algunos casos de interrupciones génicas en *T. virens*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *Trichoderma arundinaceum* y *T. harzianum* (Mach y col., 1994; Wilhite y col., 2001; Zeilinger, 2004; Rosado y col., 2007; Rubio y col., 2008; Ruocco y col., 2009; Malmierca y col., 2012, 2013).

Otra de las estrategias para analizar la función de los productos génicos consiste en la sobreexpresión de los genes en sistemas homólogos o heterólogos. Con la sobreexpresión de un gen se produce una ganancia de función como resultado de duplicaciones o amplificaciones génicas, es decir, un segmento genómico se copia varias veces, de forma que los genes contenidos en ese segmento estarán en un número

de copias muy superior al normal. La sobreexpresión de genes implicados en el micoparasitismo se ha utilizado como estrategia para incrementar la capacidad antifúngica de numerosas cepas de *Trichoderma* spp. Por citar solo algunos ejemplos, la sobreexpresión en *T. longibrachiatum* (una especie no considerada agente de biocontrol) del gen que codifica una  $\beta$ -1,4-endoglucanasa incrementó su capacidad antagonista contra *Pythium ultimum* (Migheli y col., 1998); la sobreexpresión de *ThPTR2* en *T. harzianum* demostró que la proteína codificada por este gen era un transportador de dipéptidos Leu-Leu (Vizcaíno y col., 2006a); transformantes de *T. harzianum* que sobreexpresan el gen de *T. virens* que codifica la proteína de choque térmico HSP23, mostraron una mayor resistencia a temperaturas extremas (Montero-Barrientos y col., 2007); la sobreexpresión del gen *nox1* que codifica una NADPH oxidasa en *T. harzianum* le confirió mayor actividad antagonista frente a *Pythium* (Montero-Barrientos y col., 2011); la sobreexpresión en *T. harzianum*, carente de la ruta de trichotecenos, del gen que codifica la trichodieno sintasa (*tri5*) de *T. arundinaceum*, modificó su capacidad antagonista y las respuestas de la planta durante su interacción con el hongo (Malmierca y col., 2015c); y la expresión del gen que codifica una acetamidasa (*amdS*) de *Aspergillum nidulans* en *T. harzianum*, incrementó la capacidad de este ACB para promover el crecimiento de plantas de tomate (Domínguez, 2014).

El silenciamiento génico mediado por ARN es otra estrategia para asignar función génica. El silenciamiento es un mecanismo regulador que utiliza ARNs de interferencia para suprimir, a nivel post-transcripcional, la expresión de un gen por especificidad de secuencia (Fire y col., 1998). En *Trichoderma* spp., la estrategia de silenciamiento ha permitido caracterizar algunos genes de rutas biosintéticas de SMs y asignarles, a los compuestos codificados por ellos, un papel en el antagonismo frente a patógenos y/o en las respuestas defensivas de la planta durante su interacción con ellos (Cardoza y col., 2007; Pérez y col., 2015). También, una aproximación de silenciamiento génico permitió relacionar la enzima ThPG1 de *T. harzianum* con la colonización de raíz y la inducción de defensa contra la infección en planta (Morán-Diez y col., 2009).

## 7. MONITORIZACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE LAS PLANTAS POR MICROORGANISMOS

El conocimiento del proceso de infección de una planta por parte de un patógeno, puede contribuir al desarrollo de estrategias adecuadas de protección de cultivos de interés agronómico. Las técnicas de microscopía son de gran importancia en el estudio de las interacciones planta-microorganismo ya que su visualización directa proporciona un avance relevante en el conocimiento y comprensión de las mismas. Estas interacciones se inician a nivel celular, y pueden ser cruciales para el resultado final de susceptibilidad o resistencia al establecimiento de la enfermedad.

La microscopía confocal es una tecnología que permite observaciones a una resolución mayor que la que se puede lograr con la microscopía óptica convencional, ya

que emplea un sistema láser que aplica el haz de luz en forma de barrido sobre una pequeña parte del espécimen. El láser aplicado a una longitud de onda determinada en la muestra hace que moléculas excitadas de la misma emitan fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada. La principal característica es que detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional, ello es posible gracias a que la fuente de iluminación utilizada es láser y a la existencia del 'pinhole' (diafragma de detección confocal), un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de aquella procedente de los planos de la muestra que no están enfocados. Así, se obtiene solo la información de la región enfocada, denominada "plano focal", y se elimina el resto (White y col., 1987).

La fluorescencia en una muestra puede ser debida a moléculas que se encuentran de forma natural (autofluorescencia como en el caso de la clorofila) o puede ser producida por fluorocromos, moléculas aplicadas artificialmente a la muestra. Hay una gran cantidad de fluorocromos específicos en el mercado usados para diferentes estructuras celulares y para diferente emisión de fluorescencia. El uso de varias combinaciones de láser capaces de detectar y producir fluorescencia a diferentes longitudes de onda, permite un escaneo de la muestra en un amplio intervalo del espectro de luz, permitiendo la observación de estructuras teñidas con tal detalle como no se puede lograr con técnicas convencionales. Debido a que penetra fácilmente la muestra, el microscopio confocal logra imágenes en diferentes planos focales que ligados a un programa de computo, puede reproducir una imagen tridimensional del material observado. Por tanto, esta técnica permite observar distintas dianas (marcadas con diferentes fluorocromos) dentro de una misma muestra, es decir, en este tipo de muestras, se puede estudiar la colocalización de los diferentes marcadores en una región concreta, y también permite el estudio de muestras *in vivo* a lo largo de una secuencia temporal.

Las características de la microscopía confocal que la convierten en herramienta de elección de muchos estudios biológicos incluyen:

1. Alta sensibilidad en la observación.
2. Especificidad en la emisión de la fluorescencia.
3. Gran resolución.
4. Tridimensionalidad de las imágenes.

La microscopía láser confocal ha permitido seguir los procesos de infección y colonización de *V. dahliae*, tanto de aislados silvestres como de mutantes afectados en genes de patogenicidad, en plantas como colza, espinaca, lechuga, algodón y olivo (Eynck y col., 2007; Prieto y col., 2009; Maruthachalam y col., 2011, 2013; Gao y col., 2015). Y, también, la colonización de la rizosfera de olivo por cepas de biocontrol de *P. fluorescens* (Prieto y Mercado-Blanco, 2008; Prieto y col., 2009) y de *T. harzianum* (Ruano-Rosa y col., 2016).





# OBJETIVOS

---





Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro del Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía (AGR 6082) titulado “Manejo integrado de la Verticilosis del olivo causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* mediante la utilización combinada de patrones de acebuche y hongos beneficiosos”. Este proyecto se fundamenta en la hipótesis de que la reducción del potencial de enfermedad severa durante los primeros años tras la plantación de un olivar puede llevarse a cabo mediante el uso combinado de patrones resistentes, cultivares menos susceptibles y agentes biológicos beneficiosos, capaces de proteger el sistema radical de la planta de infecciones subsiguientes a la plantación. El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar los mecanismos de acción que subyacen en la protección de olivo contra la infección por *V. dahliae* D del material biológico, vegetal y microbiano, seleccionado previamente, tanto a nivel de la capacidad antagonista de los ACBs como del diálogo molecular de éstos con la planta. A continuación se detallan los objetivos específicos del mismo:

1. Evaluar *in vitro* el potencial de biocontrol de cepas de *Trichoderma* spp. frente a diferentes cepas de *V. dahliae*.
2. Analizar en *T. atroviride* T11 los cambios transcriptómicos globales asociados con un sobrecrecimiento de la cepa D *V. dahliae* V-138I para identificar genes implicados en el micoparasitismo del patógeno por el antagonista.
3. Estudiar *in vivo* los procesos de infección y colonización de clones de acebuche y olivo resistentes y susceptibles a *V. dahliae* V-138I D, en presencia o no del antagonista *T. harzianum* CECT2413 (T34), mediante microscopía confocal.
4. Analizar la capacidad de *T. harzianum* T34 para inducir respuestas defensivas frente a la infección por *V. dahliae* V-138I D, en genotipos de olivo con distinta susceptibilidad al patógeno.







# MATERIALES Y MÉTODOS

---







## 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

### 1.1. Bacterias

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) es la cepa utilizada en experimentos de transformación por choque térmico debido a la alta eficacia que puede conseguirse (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes por cada  $\mu\text{g}$  de DNA). Entre sus características destaca la de poseer una deleción en el gen Z del operón *lac*, lo que permite seleccionar por color las células transformadas que contengan plásmidos que complementen dicha deleción.

*Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Lazo y col., 1991) es la estirpe utilizada en los experimentos de transformación por electroporación de *V. dahliae*. Presenta resistencia natural a rifampicina (25-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y a carbenicilina (100-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 1.2. Hongos filamentosos

#### Cepas de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en este trabajo.

Referencia	Especie	Cepa*	Fuente	Origen geográfico
T11	<i>T. atroviride</i>	IMI 352941	Suelo	Francia
T34	<i>T. harzianum</i>	CECT2413	Suelo	EE.UU.
GFP22	<i>T. harzianum</i>	GFP22	Ana Rincón	-
T25	<i>T. asperellum</i>	IMI 296237	Suelo	Colombia
Bt-1	<i>T. gamsii</i>	IMI 392151	Isagro S.L.	Desconocido
Bt-2	<i>T. asperellum</i>	ICC 012	Isagro S.L.	Desconocido
Bt-3	<i>T. asperellum</i>	-	Isagro S.L.	Desconocido

\*IMI: 'International Mycological Institute', Egham, Reino Unido.

\* CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia, España.

*Trichoderma harzianum* CECT2413, desde este momento denominada T34, se ha utilizado como cepa modelo en numerosos estudios genéticos.

*Trichoderma harzianum* GFP22 es la cepa utilizada en los estudios de microscopía confocal y fue recibida de la Dra. Ana Rincón de la Universidad de Sevilla. Esta cepa expresa un gen de *Aquarea victoria* que codifica una proteína verde fluorescente (GFP) (Chacón y col., 2007).

### Cepas de *Verticillium dahliae*

Los aislados de *V. dahliae* utilizados en este trabajo están indicados en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Cepas de *Verticillium dahliae* utilizadas en este trabajo.

Referencia	VCG*	Patotipo**	Huésped	Origen geográfico
V-136I	1 <sup>a</sup>	D	Olivo	Sevilla (España)
V-138I	1 <sup>a</sup>	D	Algodón	Córdoba (España)
V-1305I	1 <sup>a</sup>	D	Olivo	Jaén (España)
V-1383I	1 <sup>a</sup>	D	Olivo	Jaén (España)
V-1477I	1 <sup>a</sup>	D	Olivo	Córdoba (España)
V-T9	1 <sup>a</sup>	D	Algodón	California (EE.UU.)
V-1558I	2 <sup>a</sup>	ND	Olivo	Huelva (España)

\*VCG: Grupo de compatibilidad vegetativa.

\*\*D: defoliante; ND, no defoliante.

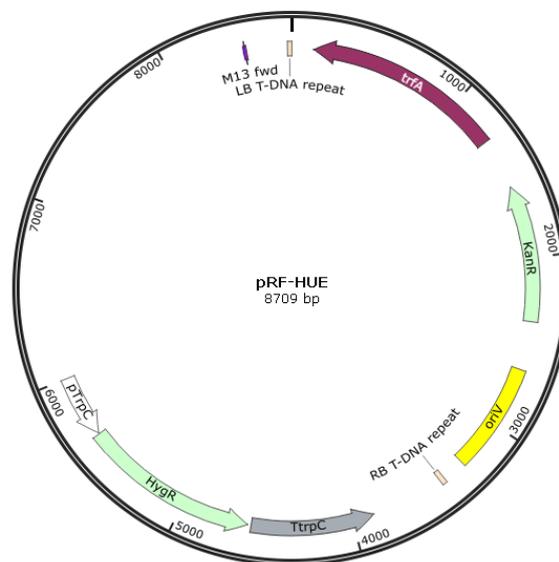
*Verticillium dahliae* D V-138I es un aislado monoconídico altamente virulento sobre algodón y olivo (Bejarano-Alcázar y col., 1996; Mercado-Blanco y col., 2002, 2003a,b, 2004), perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) 1A. Este aislado forma parte de la colección del Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible, (CSIC), Córdoba, España. Originalmente fue aislada de plantas de algodón infectadas en el Valle del Guadalquivir (Bejarano-Alcázar y col., 1996) y fue caracterizada, en estudios anteriores, usando el olivo como huésped (Rodríguez-Jurado y col., 1993; Mercado-Blanco y col., 2001, 2002).

### 1.3. Material vegetal

Se utilizaron plántones certificados de los clones de acebuche Ac-4, Ac-15 y Ac-18 y olivo “Picual” de 3 a 8 meses de edad y entre 10 y 15 cm de altura, con diferente nivel de resistencia y susceptibilidad a *V. dahliae* D; siendo “Ac-4” y “Ac-18” resistentes al patógeno y “Ac-15” y “Picual” susceptibles al mismo. Este material vegetal fue propagado por el vivero Plantas Continental S.A. (Posadas, Córdoba, España) mediante autoenraizado de estaquillas semileñosas, crecidas en macetas que contenían una mezcla pasteurizada, turba:arena 2:1 (v/v), y mantenidas bajo condiciones de invernadero según se describe en Caballero y del Río (2001).

## 2. VECTORES UTILIZADOS

**pRF-HUE** (Frandsen y col., 2008) (8709 pb) es un plásmido binario que contiene regiones de reconocimiento para la inserción, conocidas como ‘Left Border’ (LB) y ‘Right Border’ (RB). Este plásmido dispone de un sitio de clonación aguas abajo del promotor constitutivo del gen de la gliceraldehido 3-fostato-deshidrogenasa A (*PgpdA*) procedente de *A. nidulans*. Además, presenta genes marcadores que confieren resistencia a higromicina (*HygR*) en hongos y kanamicina (*KanR*) en bacterias (Fig. 8). Este plásmido se empleó para la construcción del plásmido pRF-HUE-YFP de integración ectópica en el genoma de *V. dahliae*, que permite una expresión constitutiva del gen *eYFP*.



**Figura 8:** Esquema del vector binario pRF-HUE utilizado en este trabajo.

**gYFP** (9.240 pb) es un vector que se emplea para la expresión constitutiva de YFP en hongos filamentosos mediante transformación por protoplastos (Maor y col., 1998; Sukno y col., 2008). En este trabajo fue utilizado como fuente del gen *eYFP*, que se amplificó por PCR, y posteriormente construir el vector binario pRF-HUE, el cual se utilizó para transformar en *V. dahliae* mediante *A. tumefaciens*.

## 3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1 atm durante 20 min, salvo que expresamente se indique otro método.

### 3.1. Medios de cultivo para hongos

#### Caldo patata dextrosa (PDB)

Este medio presentado en forma de polvo fue adquirido a Difco y se preparó resuspendiendo 24 g en 1 L de agua destilada. Se empleó como medio de cultivo líquido general para el crecimiento de hongos.

**Medio agar y extractos de levadura y de ciruela (AEC)** (Bejarano-Alcázar y col., 1996).

Se empleó como medio específico para el crecimiento de *V. dahliae*.

Composición:

Extracto de ciruela*	100 mL
Extracto de levadura	1 g
Lactosa	5 g
Agar	32 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1 L

El pH se ajustó hasta 5,6 -6,0.

\* Se añadieron 5 g de ciruelas secas por cada 100 mL de agua destilada, y se hirvió en el autoclave a 110°C durante 30 min. Posteriormente, se filtró a través de dos gasas superpuestas y un embudo preparado con papel de filtro.

#### Medio CM

Se empleó como medio líquido de crecimiento de *Trichoderma*.

Composición:

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

Para su utilización como medio sólido, se añadieron 15 g de agar por cada litro de medio.

#### Medio agar-agua (AA)

Es un medio de cultivo nutricionalmente pobre que permite un crecimiento lento de los hongos. Fue empleado en la obtención de cultivos monospóricos. Se preparó a una concentración de agar del 1%.

#### Medio patata dextrosa agar (PDA)

Este medio presentado en forma de polvo fue adquirido a Difco y se preparó resuspendiendo 39 g en 1 L de agua destilada. Se empleó como medio de cultivo sólido general para el crecimiento de hongos.

### 3.2. Medios de cultivo para plantas

**Solución nutritiva Hoagland** (Hoagland y Arnon, 1950).

Se empleó como solución de fertilización para el crecimiento de las plantas de olivo y acebuché.

Composición:

Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O 0,5 M	118,8 g
KNO <sub>3</sub> 0,5 M	50,5 g
MgSO <sub>4</sub> 0,5 M	123,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M	68 g
Fe 6% quelado con EDDHA *	9,4 g
KCl 25 mM	1864 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 12,5 mM	773 g
MnSO <sub>4</sub> 1mM	169 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 1mM	288 g
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O 0,25 mM	63 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O 1,4 mM	337 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p. 1 L	

\* **EDDHA**: ácido etilendiamino-di (O-hidroxifenil acético).

### 3.3. Medios de cultivo para bacterias

**Medio Luria-Bertani (LB)** (Miller, 1972).

Se empleó como medio general para el crecimiento de *E. coli*.

Composición:

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

El pH se ajustó hasta 7,5

Para preparar el medio sólido se añadieron 20 g de agar por cada litro de medio.

#### **Medio SOB**

Se empleó como un medio base para la preparación de células competentes de *E. coli*.

Composición:

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

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

### Medio SOC

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

### Medio Mínimo (MM) (Hooykaas y col., 1979)

Utilizado como medio mínimo para el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Composición:

Tampón fosfato potásico pH 7,0	10 mL
Solución M-N	20 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1% (p/v)	1 mL
Glucosa 20% (p/v)	10 mL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 20% (p/v)	2,5 mL

Tras autoclavar se añadieron:

FeSO <sub>4</sub> 0,01% (p/v) (filtroesterilizado)	10 mL
Elementos traza	5 mL
Kanamicina 50 mg/mL	1 mL
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p 1 L	

**Tampón fosfato potásico pH 7,0:** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (200 g) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (145 g), para 1 L de solución.

**Solución M-N:** MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (30 g) y NaCl (15 g), para preparar 1 L de solución.

**Elementos traza:** ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (100 mg), CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O (100 mg), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (100 mg), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (100 mg) y Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O (100 mg) para preparar 1 L de solución.

### Medio de Inducción (MI) (Hooykaas y col., 1979)

Utilizado como medio de inducción de *A. tumefaciens*.

Composición:

Tampón fosfato potásico pH 7,0	10 mL
Solución M-N	20 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1% (p/v)	1 mL
Glucosa 20% (p/v)	5 mL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 20% (p/v)	2,5 mL
MES 1M (pH 5,3)	4 mL
Glicerol 50 %	10 mL

Tras la esterilización en autoclave se añadieron:

FeSO <sub>4</sub> 0,01% (p/v) (filtroesterilizado)	10 mL
Elementos traza	5 mL
Kanamicina 50 mg/mL	1 mL
Acetosiringona 100 mM (filtroesterilizada)	2 mL
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p 1 L	

## 4. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS

### 4.1. Cultivo y mantenimiento de bacterias

Los cultivos bacterianos crecieron, en sus medios correspondientes, entre 200 y 250 rpm y 37 (*E. coli*) o 28°C (*A. tumefaciens*) durante 12 o 14 y 24 o 48 h, respectivamente. Las bacterias se mantuvieron durante cortos periodos de tiempo en placas Petri, selladas con Parafilm<sup>®</sup>, a 4°C. Para periodos más largos de tiempo, se prepararon suspensiones de las mismas en glicerol al 25% (v/v), y se conservaron a -80°C.

### 4.2. Cultivo y mantenimiento de los hongos

El mantenimiento rutinario de las cepas de *Trichoderma* spp. se llevó a cabo mediante resiembras periódicas en placas conteniendo medio PDA. Las placas se inocularon depositando, en el centro, un cilindro de agar de 0,5 cm de diámetro procedente de una zona de crecimiento activo de un cultivo anterior, o de 5 a 10 µL de una suspensión de esporas. La temperatura de incubación varió de 24 a 28°C. Una vez que los cultivos habían crecido, las placas se sellaron con Parafilm<sup>®</sup> y se mantuvieron a 4°C durante periodos inferiores a un mes. Para periodos más largos de tiempo, se recogieron esporas según se describe en el siguiente apartado, y se prepararon suspensiones de las mismas en glicerol al 15% (v/v) que se conservaron a -80°C. Para su recuperación, se tomaron alícuotas de 100 a 200 µl y se sembraron en un medio adecuado.

Debido a que el cultivo continuado de *V. dahliae* en medios artificiales nutricionalmente ricos conlleva el riesgo de atenuación de la virulencia de la estirpe (degradación), se optó por su mantenimiento en agua o glicerol estériles, mediante de pequeños fragmentos de medio de cultivo que contenían una porción de colonia fúngica con gran cantidad de microesclerocios. Para ello se partió de cultivos monospóricos crecidos durante 4 semanas en PDA a 25°C, de los cuales se recogieron para cada aislado de cinco a seis porciones cuadradas de aproximadamente 0,5 cm de lado y se colocaron dentro de criotubos estériles que contenían agua ultrapura estéril o glicerol al 10% (v/v) y se conservaron a 4 o -20°C según contuvieran agua o glicerol, respectivamente. Para la recuperación de cultivos activos, se colocaron uno o dos de los trozos colonizados en un medio de cultivo adecuado. La manifestación más obvia de degradación en los cultivos de *V. dahliae* es la formación en la colonia de sectores de micelio hialino o semi-hialino, y la reducción o pérdida de capacidad para producir conidias. La degradación de los cultivos se corresponde también con una disminución de la virulencia de los aislados. Debido a que se pueden seleccionar involuntariamente estos segmentos degradados de los subcultivos obtenidos, se han descrito diversas técnicas para el mantenimiento de *V. dahliae* a largo plazo (Harris, 1998).

### **4.3. Recogida de esporas**

Para la obtención de esporas, los hongos se cultivaron en PDA el tiempo suficiente para que la superficie de la placa estuviera cubierta por esporas, de 5 a 7 días para las cepas de *Trichoderma* spp. y de 12 a 15 días para las de *V. dahliae*, a una temperatura comprendida entre 24 y 28°C para *Trichoderma* spp. y a 25°C para *V. dahliae*. Las esporas se recogieron en campana de flujo laminar añadiendo 5 mL de agua destilada estéril por placa y raspando la superficie con una espátula. A continuación se filtró la suspensión de esporas a través de lana de vidrio o de varias capas de gasa estéril para eliminar los restos de micelio. Las esporas se almacenaron a 4°C hasta su uso en el curso de las 24 h de su obtención.

### **4.4. Crecimiento del olivo y acebuché**

Los plantones de olivo y acebuché, una vez propagados, se cultivaron en macetas de plástico de 9x9x10 cm que contenía un sustrato cuya composición y tratamiento se detallará en los diferentes ensayos. Los plantones se regaron de forma regular, según necesidad, se fertilizaron cada 2 semanas con la solución nutritiva Hoagland y se mantuvieron de manera habitual en cámara de crecimiento ajustada a 24±1°C, con una humedad relativa del 60 al 90% y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente de 360  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

## **5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **5.1. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó siguiendo diferentes protocolos según el material de partida fuera fúngico, vegetal o plasmídico, y teniendo en cuenta el ensayo al que fuera destinado, por calidad o por cantidad.

#### **5.1.1. Extracción de ADN genómico de hongos filamentosos a pequeña escala**

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

1. Se recogió micelio de *Trichoderma* o de *V. dahliae* crecido en PDA sobre membranas de celofán durante 2 o 7 días, respectivamente, y se liofilizó.
2. Se pulverizó el micelio liofilizado en presencia de nitrógeno líquido.
3. Se recogieron 40 mg de micelio pulverizado en un tubo y se le añadieron 400  $\mu\text{L}$  del tampón de lisis y se homogeneizó por agitación durante 30 s en un agitador Silamat<sup>®</sup> S5.

4. A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de fenol y 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo:alcohol isoamílico (CIA) (24:1) y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 6.000 x g durante 30 min a temperatura ambiente.
5. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo, se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de una solución 10 mg/mL de ARNasa y se incubaron a 37°C durante 15 min con objeto de eliminar el ARN existente.
6. Posteriormente, se añadió un volumen de fenol/CIA (25:24:1) y se mezcló delicadamente, y las fases se separaron por centrifugación a 6.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente.
7. La fase superior se transfirió a otro tubo nuevo y se añadió un volumen de CIA (24:1). Se mezcló delicadamente y se volvió a centrifugar a 6.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente.
8. De nuevo, la fase superior se transfirió a otro tubo para proceder a la precipitación del ADN utilizando 1/10 del volumen de acetato sódico (AcNa) 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y manteniendo la mezcla, durante al menos 2 h, a -20°C.
9. La muestra se centrifugó a 19.500 x g durante 20 min a 4°C y se retiró el sobrenadante.
10. El precipitado se lavó con 1 mL etanol al 70 % con objeto de eliminar las sales, y se centrifugó a 15.300 x g durante 5 min a temperatura ambiente, retirando de nuevo el sobrenadante.
11. Después, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril.

**Tampón de lisis:** Tris-HCl 200 mM, pH 8,5, NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS al 0.5 %, este último añadido tras autoclavar el tampón y en el momento de su utilización.

### 5.1.2. Extracción de ADN genómico de planta

#### Hoja

La extracción de ADN genómico de hojas de acebuche y olivo se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Claros y col. (2000) con ligeras modificaciones.

1. Se partió de 100 a 500 mg de hojas, previamente liofilizadas durante 24 h y trituradas en un mortero con nitrógeno líquido para favorecer la ruptura de las membranas y paredes celulares.
2. Al polvo vegetal se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis y un 0,2% (v/v) de 2-mercaptoethanol, y la mezcla se homogeneizó por agitación durante 30 s en un agitador Silamat<sup>®</sup> S5.
3. Para inhibir la acción de los compuestos polifenólicos que oxidan el ADN se añadieron 10 mg de polivinil pirrolidona (PVP, Sigma) y se incubó la muestra de 30 a 60 min a 65°C, enfriándola posteriormente en hielo.

4. Para eliminar los restos celulares se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de CIA (24:1), se agitó vigorosamente en un vórtex y se centrifugó a 9.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de ARNasa 10 mg/mL y la muestra se incubó durante 30 min a 37°C.
6. A continuación, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía 10% de CTAB y 0,7 M NaCl, se mezcló vigorosamente, se añadieron 1,5 volúmenes de CIA (24:1) y se centrifugó a 11.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
7. Tras recoger el sobrenadante, se añadieron 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C) y 1/10  $\mu\text{L}$  de AcNa 3M pH 7 y, para facilitar la precipitación del ADN, la muestra se mantuvo de 3 a 5 h a -20°C.
8. Posteriormente, el ADN se recogió por centrifugación a 2.500 x g durante 20 min a 4°C y se retiró el sobrenadante.
9. El precipitado se lavó con 1 mL etanol al 70 % y centrifugación a 2.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente, para retirar las sales, y se descartó el sobrenadante.
10. Por último, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 40  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril.

**Tampón de lisis:** Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,4M; EDTA 20 mM pH 8; CTAB 2%.

### **Raíz**

Para llevar a cabo la extracción de ADN de raíz de acebuche y olivo se utilizó el 'Kit FavorPrep™ Soil DNA Isolation' (Favorgen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **5.1.3. Extracción de ADN plasmídico**

La extracción de ADN plasmídico para llevar a cabo las transformaciones tanto de *Trichoderma* como de *V. dahliae* se realizó mediante una minipreparación de ADN siguiendo, con ligeras modificaciones, el protocolo del 'Kit Plasmid-Preps Using Wizard' (Promega).

1. Se inocularon 3 mL de LB líquido suplementado con kanamicina (50 mg/mL) con una colonia de *E. coli*, y se incubaron a 200 rpm durante 12 o 15 h a 37°C.
2. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 5.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante.
3. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de solución de resuspensión y se resuspendió el precipitado.
4. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis, se mezcló invirtiendo el tubo 10 veces y se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de solución de neutralización y se mezcló invirtiendo el tubo 10 veces.
6. Se centrifugó a 20.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a otro tubo.

7. El ADN se precipitó añadiendo 800  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío y centrifugando a 20.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente.
8. Tras retirar el sobrenadante, se dejó secar el precipitado manteniendo la muestra durante 15 min a temperatura ambiente.
9. Finalmente, se resuspendió utilizando de 40 a 100  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril y se purificó el ADN extraído según se describe en el apartado 5.2.

**Solución de resuspensión:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM; ARNasa A 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Tampón de lisis:** NaOH 0,2 M; SDS 1%.

**Solución de neutralización:** KAc 1,32 M pH 4,8.

### **Extracción de ADN de colonias**

Se empleó como método de rutina para la obtención rápida de ADN de colonias de *E. coli* y *A. tumefaciens* cuando no era necesaria una elevada calidad ni cantidad del mismo.

1. En campana y con un palillo estéril se picó la colonia y se agitó dentro de un tubo que contenía 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril.
2. Se incubó en agua hirviendo durante 5 min.
3. Se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min.
4. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se guardó a 4°C hasta su uso.

### **5.2. Purificación del ADN**

Se utilizó este protocolo cuando era necesario disponer de ADN de gran pureza.

1. Se añadió un volumen de una solución fenol/CIA (25:24:1) igual al de la muestra de partida y se agitó vigorosamente.
2. La fase acuosa, conteniendo el ADN, se separó por centrifugación a 18.500 x g durante 5 min a temperatura ambiente, y se transfirió a un tubo nuevo.
3. Se añadió un volumen igual al de la muestra de la mezcla CIA (24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 18.500 x g durante 2 o 5 min a temperatura ambiente.
4. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se añadieron de 2,5 a 3 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 de AcNa 3M pH 5,2 y la muestra se mantuvo, al menos, 30 min a -20°C.
5. Posteriormente, se centrifugó a 16.100 x g durante 20 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
6. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70% y centrifugando a 18.500 x g durante 5 min a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante.
7. Por último, el precipitado que contenía el ADN se resuspendió utilizando entre 20 y 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril.

### 5.3. Extracción de ARN

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

#### Método del TRIZOL<sup>®</sup>

Para llevar a cabo la extracción de ARN tanto de *Trichoderma* como de *V. dahliae* se utilizó el método del TRIZOL<sup>®</sup> (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones:

1. Se partió aproximadamente de 50 mg de micelio pulverizado en presencia de nitrógeno líquido. El micelio se depositó en un tubo y se añadió 1 mL del reactivo TRIZOL<sup>®</sup>.
2. La muestra se homogeneizó por agitación durante 30 s en un agitador Silamat<sup>®</sup> S5 y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.
3. Se añadieron 200 µL de cloroformo, se agitó con un vórtex durante 15 s y se incubó entre 2 y 15 min a temperatura ambiente.
4. Con el fin de eliminar los restos celulares, se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min a 4°C.
5. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se añadieron 500 µL de isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la precipitación del ARN.
6. A continuación, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante del tubo, dejando solo el precipitado de ARN.
7. Este precipitado se lavó, por repetido pipeteo, con 1 mL de etanol-DEPC al 75% y se centrifugó de nuevo a 7.500 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
8. El etanol se eliminó por inversión y el precipitado se dejó secar al aire, utilizando después para resuspenderlo entre 25 y 50 µL agua destilada tratada con DEPC.
9. Finalmente, el ARN se incubó a 55°C durante 15 min para ayudar a su completa resuspensión y se guardó a -20°C.

#### ARN para 'microarrays'

Se realizaron confrontaciones entre T11 y V-138I, según se describe en el apartado 10.1 pero con ligeras modificaciones. El patógeno se incubó durante 4 días a 25°C, en placas que contenían medio PDA cubierto de una membrana de celofán. Transcurrido ese tiempo, las placas que contenían la colonia del patógeno fueron inoculadas en el borde opuesto con la cepa T11. En paralelo, como control, se sembró T11 en placas de PDA con membrana de celofán pero sin patógeno (CON).

Se recogió micelio del borde de la colonia de T11 que estaba a 0,5 cm de distancia del borde de la colonia del patógeno (NV) y de la zona de interacción *Trichoderma-V. dahliae* de placas donde había sobrecrecido 0,5 cm la colonia del patógeno (OV). El micelio se recogió de 5, 10 y 20 placas, respectivamente, de cada una de las tres condiciones de cultivo consideradas.

La extracción del ARN se llevó a cabo siguiendo el método del TRIZOL<sup>®</sup> y según se describe en el apartado 5.3.1.

### **ARN de acebuche y olivo**

Para las extracciones de ARN de plántones de acebuche y olivo, tanto de raíz como de hoja, las muestras se liofilizaron durante 24 h y se pulverizaron en mortero en presencia de nitrógeno líquido. Para su extracción se partió de 0,1 mg de material vegetal y se utilizó el ‘Kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant’ (Machery-Nagel) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

## **6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **6.1. Cuantificación y calidad de ácidos nucleicos**

#### **6.1.1. En ensayos generales**

La determinación de las concentraciones de ácidos nucleicos (ADN, ARN o ADNc) presentes en las diferentes muestras se realizó utilizando el equipo NanoDrop Spectrophotometer<sup>®</sup> ND-1000 (Thermo Scientific). Se trata de un espectrofotómetro ultrasensible de medición de ácidos nucleicos, que da una medida de la concentración de los mismos en ng/μL, además de un dato de la medida a diferentes densidades ópticas, teniendo como resultados las relaciones entre las D.O. 260/280 y 260/230, que indican el grado de contaminación en proteínas y azúcares, respectivamente. Para la estandarización del blanco se utilizó agua ultrapura para el ADN y el ADNc o agua con DEPC para el ARN. La cantidad de ácidos nucleicos se calculó considerando que, una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 μg/mL para ADN, 33 μg/mL para ADNc y 40 μg/mL para ARN (Sambrook y Russell, 2001).

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

#### **6.1.2. En ‘microarrays’**

Para el estudio mediante ‘microarrays’, el análisis de las muestras de ARN total se llevó a cabo en un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), siguiendo

las instrucciones del fabricante. El sistema está basado en una electroforesis convencional pero desarrollada sobre un 'chip'. Las moléculas fluorescentes son intercaladas entre las moléculas de ARN que migran en función de su tamaño. La señal fluorescente emitida es transformada en bandas (similares a las obtenidas en un gel de agarosa) y picos (electroferograma). En el electroferograma se determina el área obtenida para los picos que corresponden con el ARN 18S y 28S. Con ayuda de un marcador, con una relación concentración/área conocida, se extrapolan los resultados de área obtenidos para las muestras.

## **6.2. Manipulación enzimática de los ácidos nucleicos**

### **6.2.1. Tratamiento enzimático de ADN**

#### **Digestión**

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

1. Se mezclaron en un tubo: 1/10 del volumen total de digestión de tampón de digestión (10X), la cantidad adecuada de ADN resuspendido en agua, las unidades que se consideraron necesarias de la enzima y agua destilada estéril hasta completar el volumen de la digestión.
2. La mezcla se incubó a la temperatura adecuada (normalmente 37°C) entre 7 y 24 h.
3. En el caso de digestiones simultáneas con dos enzimas, el tampón utilizado fue aquel en el que ambas enzimas presentaban la máxima actividad. Si las enzimas no eran compatibles, la digestión se llevó a cabo en dos pasos.

#### **Ligación de moléculas de ADN**

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima USER (BioLabs) siguiendo las recomendaciones de Fradsen y col. (2008). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10 µL, conteniendo 1 µL de tampón de PCR 10X, 1 µg de ADN vector, y entre 0,5 y 1 µg de ADN inserto y 1 U de USER. La ligación se incubó a 37°C durante 30 min y, posteriormente, a 25°C otros 30 min.

## **6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Esta técnica nos permite amplificar selectivamente un segmento específico de ADN, hasta obtener una cantidad suficiente para su posterior análisis o manipulación (Mullis y Faloona, 1987). Se ha convertido en una técnica básica en biología molecular debido a su sencillez, rapidez y bajo coste.

### 6.3.1. Reacción de PCR clásica

Las reacciones de PCR convencionales se realizaron empleando Taq polimerasa (Biotools). La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  conteniendo el ADN molde, 5  $\mu\text{L}$  de tampón de PCR 10X (conteniendo  $\text{MgCl}_2$ ), 400  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 1,5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido y 2,5 U de polimerasa.

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

### 6.3.2. PCR a tiempo real ('Real-time' PCR o qPCR)

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

Se utilizó el 'Kit KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR' (Kapa Biosystems) y la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , siguiendo las instrucciones del proveedor. La mezcla contenía 5  $\mu\text{L}$  de KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST 2X, 200 nM de oligonucleótido 'forward', 200 nM de oligonucleótido 'reverse' y 2  $\mu\text{L}$  de ADNc (conteniendo menos de 10 ng).

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

Para cada par de oligonucleótidos se llevó a cabo una curva estándar para el cálculo de la eficiencia de la reacción.

Idealmente, la eficiencia de una reacción de PCR sería del 100% (pendiente de -3.32), lo que significa que el transcrito se duplica tras cada ciclo durante la fase exponencial de la amplificación. En la práctica, valores de eficiencia de entre 90 y 110% son considerados como buenos.

Además cada par de oligonucleótidos utilizados en las reacciones PCR en tiempo real (qPCR) también fueron analizados mediante una curva de disociación, para determinar posibles productos inespecíficos como la formación de dímeros y otras contaminaciones en la reacción de PCR, así como para determinar su especificidad.

Para calcular la expresión relativa, se utilizó el modelo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que parte del supuesto de que la eficiencia con la que se amplifica el gen problema y el gen de referencia es óptima e idéntica (correspondiente al 100%) (Livak y Schmittgen, 2001). Con este método se comparan directamente los Cts del gen problema y del gen de referencia ( $\Delta Ct$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta Ct$  de la muestras experimental con respecto a la muestra control. Un Ct es el ciclo donde se encuentra una cantidad de ADN detectable, o sea que sobrepasa el umbral de fluorescencia basal, en una muestra. En este trabajo los niveles de expresión génica se representan como el logaritmo en base 10 ( $\log_{10} 2^{-\Delta\Delta CT}$ ) y, para comparaciones, en las muestras control se da un valor de 0.

### 6.3.3. Obtención de ADN complementario (ADNc): transcripción inversa

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARN se empleó el ‘kit’ comercial de ‘PrimeScript™ RT reagent’ (Takara). La transcripción inversa se realizó a partir de 500 ng de ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. Se mezclaron, en un tubo de microcentrífuga y por este orden, 2  $\mu$ L del tampón 5X PrimeScript, 0,5  $\mu$ L de oligodT (50  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L de la mezcla que contenía el enzima (PrimeScript™ RT Enzyme Mix I), 500 ng de ARN, y agua tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen final de 10  $\mu$ L.
2. La mezcla se incubó durante 15 min a 37°C para que se produjera la transcripción reversa.
3. A continuación, se incubó 5 s a 85°C para inactivar la reacción y, finalmente, se pasó a un baño de hielo.
4. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 6.3.4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Sigma-Aldrich y se recogen en las Tablas 5, 6 y 7. La mayoría de los oligonucleótidos utilizados en este estudio, se diseñaron utilizando el programa ‘Perlprimer’.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados en la validación de los ‘microarrays’ mediante qPCR, utilizando como molde ADNc de *T. atroviride*.

Función putativa	ID JGI*	Secuencia (5'-3')	Pendiente	Eficiencia (%)
Exo- $\beta$ -1,3-glucanasa	48371	Fw: ACCAACGATGGTGATGGTCTT Rv: GGTTGCCAGTGCTGGAGATG	-3,24	103,6
Quitinasa	52592	Fw: ATTCAGCACCCCTCAGTCCTGTGGC Rv: GCTGGCAATCAAACCTGTGGTTCA	-3,72	85,7
Taumatina	224184	Fw: CATTCTCTTCTCCCGTTTGTGGC Rv: GGTCAGAGTTGGCGAGGTGCT	-3,86	81,7

Transportador de oligopéptidos	232557	Fw: CTTCGCCTGGATGACGTGGAT Rv: GCGGGAGGGAGTAGGTGG	-3,35	98,7
Tioesterasa	282317	Fw: CTTTCGAGGGAGATAACGACTG Rv: GGGATTAAGGACAGACACGG	-3,22	104,3
Metaloproteasa	179435	Fw: TGGCGATTATATTGCAGATACTCC Rv: TAAATTCAGACCAGCAGCCCT	-3,31	100,7
Citocromo P450 monooxigenasa	295844	Fw: AATGCGCTCTACGATGTTTATGG Rv: CATGTTGCACCTTGTTACTGAG	-3,36	98,5
Proteinasa alcalina	302419	Fw: GCGGGCGAGTTTGACGAGG Rv: CCCAAGGAGCACCAGATTGTGTG	-3,06	112,5
Carboxipeptidasa	301733	Fw: CGCACATTCATCAACGGCAACA Rv: CCTCTTTGACCTGGGCGTTGG	-3,26	102,4
Halogenasa dependiente de flavina	32449	Fw: GCTGATAAGTTTCCACGATAACC Rv: AAATCTGTATATCCTTCCCGCT	-3,33	99,5
Proteína de biosíntesis de pneumocandina	51260	Fw: CTCAATGGCTTGTCAGATTTCGT Rv: AGACTGTTGAAGAATACACCCTG	-3,53	92,1
$\alpha$ -1,3 glucanasa	81097	Fw: CATTTTCATGATCGGCATTGTTGG Rv: GCGTATTGAGCAATCTTCTGG	-3,37	98,0
$\alpha$ -acetolactato descarboxilasa	48180	Fw: GCCACGGGAACCACGGCCT Rv: GACGGAGGGCTGGAAGGAGGT	-3,17	107,0
Serina proteinasa ( <i>aorsin</i> )	145909	Fw: CTATCTCGAGCGCCAATGTG Rv: GTACTGGCTTGGTAGCTTGG	-3,31	100,3
Transportador MFS**	41962	Fw: CAAAGTTCTCAACTGCGTCCT Rv: GATGACGAAGACGATGAAGCC	-3,55	91,39
Fosfatidilserina descarboxilasa	146755	Fw: AATCTTGGGACGACTTCTTTACAC Rv: AATGCCTGATAAACTGTTGCTCC	-3,48	94,0
Actina		Fw: ATCGGTATGGGTCAGAAGGA Rv: ATGTCAACACGAGCAATGG	-3,46	94,6

\*ID JGI: Identidad en el 'Joint Genome Institute'.

\*\* MFS: 'Mayor Facilitator Superfamily'.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos utilizados en PCR convencional para la construcción y selección de transformantes de *V. dahliae*.

Nombre	Aplicación	Secuencia (5'-3')	Amplificación (pb)
YFP-User	Amplificación del inserto YFP	Fw: GGACTTAAUATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG Rv: GGGTTTAAUTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	721
Hph	Comprobación de construcción	Fw: GCGCTTCTGCGGGCGATTTG Rv: CGGGTTTCGGCCATTTCGGAC	549

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados en qPCR cuando se empleó como molde ADNc de olivo.

Gen	Utilidad	Secuencia (5'-3')	Pendiente	Eficiencia (%)
<i>PR-5</i>	Señalización de ruta de SA	Fw: GTGGCGGTCTGAAGACTTGAC Rv: CAATTAGTACGCCCCAGATTC	-3,05	112,6
<i>PAL</i>	Señalización de SA	Fw: CGTGTGGTTGATCGCGAATA Rv: TTGTCTGAGTTTTTGCATCAATGG	-3,07	111,9
<i>LOX2</i>	Señalización de ruta de JA	Fw: CCTCCCAGCCGATCTCATTA Rv: CCCGTCTGTTGCATAGGGATA	-2,95	118,4
<i>EIN3</i>	Señalización de ruta de ET	Fw: AGGATACAACCCTCGGATCACTT Rv: TCTAATGGAAACCGCCTCGA	-3,10	110,0
<i>WRKY4</i>	Señalización de ruta de SA	Fw: GGTTGAGTCCTTCTGGATTGC Rv: GCCTGCTGGTGGGACATT	-3,27	102,0
<i>ACS7</i>	Señalización de ET	Fw: CCACTTGGAGCCACCATTAAAAG Rv: GCAACGCTTACAAATTCGTCGC	-3,28	101,7
<i>IAA9</i>	Señalización de auxinas	Fw: GTATAATTCCTGGATTATCGTGT Rv: AAGAACTCTCTGATGCCTTG	-3,28	101,7
<i>ACT</i>	Gen endógeno	Fw: CAGGATCTTGAGACTGCCAAG Rv: CCATTCCAATCAAAGAAGGCTG	-3,14	108,3

Números de acceso: *PR-5*, ACZ57583.1; *PAL*, KJ511868.1; *LOX2*, ACD43484.1; *EIN3*, HQ008856.1; *WRKY4*, KF953482.1; *ACS7*, HQ008854.1; *IAA9*, FJ392831.2; *ACT*, AF545569.1.

## 6.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

### 6.4.1. Electroforesis de ADN

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

1. Se añadió la cantidad adecuada de agarosa al volumen necesario de tampón TAE 1X y se fundió por ebullición en un microondas.
2. Se dejó enfriar hasta unos 55 o 60°C. En este punto, se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final aproximada de 0,1 µg/mL.
3. Se vertió el gel en la bandeja de electroforesis y se dejó que solidificara.
4. Se prepararon las muestras añadiendo tampón de carga 6X.
5. Se llevó a cabo la electroforesis en tampón TAE 1X aplicando un voltaje aproximado de 4 V/cm de longitud de la cubeta, incluyendo marcadores de peso molecular comerciales.
6. Se visualizaron las bandas mediante iluminación con luz ultravioleta, y se fotografió el gel si procedía.

**Tampón TAE 50X:** Tris-acetato 2 M pH 8,0; EDTA 50 mM. Se pesaron 242 g de Tris y se añadieron 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0.

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

#### **6.4.2. Electroforesis de ARN**

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

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

### **6.5. Purificación**

#### **6.5.1. Fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Los fragmentos de ADN de interés se cortaron del gel de agarosa con ayuda de un bisturí y se purificaron con el 'kit' comercial 'NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up' (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **6.5.2. ARN para 'microarrays'**

Para purificar el ARN total de *T. atroviride* que posteriormente se emplearía en la hibridación de 'microarrays', se utilizó el 'kit' comercial "RNeasy MiniElute Cleanup" (Qiagen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### **6.6. Secuenciación de ADN**

La secuenciación de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, utilizando 3 pmoles de oligonucleótidos de interés por reacción. Se usaron entre 400 y 600 ng de ADN plasmídico (en un volumen de 8 µL de agua ultrapura estéril) extraído de *E. coli* y *A. tumefaciens* tal y como se indica en el apartado 5.1.3. La secuenciación directa de productos de PCR se realizó a partir de 100 ng de ADN por kb de longitud del producto.

## 7. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

### 7.1. Obtención de proteínas intracelulares

Las proteínas intracelulares se obtuvieron a partir de micelios de la cepa *T. atrovide* crecidas en PDA bajo las condiciones descrito en el apartado 5.3.2.

El micelio recogido se liofilizó durante 8 h y se pulverizó en presencia de nitrógeno líquido.

1. Se utilizaron 0,5 mL de una solución Tris 100 mM pH 7,5 por cada 50 mg de micelio liofilizado y pulverizado.
2. La mezcla se homogeneizó usando el Thermomixer (Eppendorf) a 1.000 rpm y una temperatura de 4°C e incubando 1 h.
3. Seguidamente, se recogieron los sobrenadantes mediante centrifugación a 12.000 x g durante 20 min a 4°C, y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

### 7.2. Cuantificación de proteínas intracelulares

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) y usando seroalbúmina bovina como proteína estándar (BSA, Sigma).

Para reacciones de 1 mL de volumen final, se mezclaron 8 µL del extracto proteico diluido en agua ultrapura hasta un volumen final de 800 µL con 200 µL del reactivo Bradford. Las muestras se homogenizaron e incubaron durante 15 min a 37°C y se midió la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína se determinó por extrapolación sobre una recta patrón realizada simultáneamente con diluciones seriadas de BSA en un rango de concentraciones conocidas entre 0 y 20 µg/mL.

### 7.3. Actividad proteasa

La actividad proteasa se determinó utilizando el método descrito por Holwerda y Rogers (1992). La mezcla de reacción se preparó en un volumen de 500 µL añadiendo: 10 µg de extracto proteico y tampón acetato 50 mM pH 5,5 hasta un volumen de 325 µL, después se añadieron 125 µL de Brij 35 (Sigma) al 0,1% (v/v). Esta premezcla se incubó a 30°C durante 5 min y se añadieron 50 µL de sustrato azocaseína al 1% (p/v) (Sigma), previamente calentada. La muestra se incubó a 30°C durante 90 min y la reacción se paró con 400 µL de ácido tricloroacético al 10% (p/v). Para precipitar toda la azocaseína no hidrolizada, se centrifugó la reacción a 17.900 x g durante 10 min, se recogió el sobrenadante y se midió en éste la absorbancia a 366 nm. En paralelo, se obtuvo una recta patrón con concentraciones conocidas de azocaseína, en un rango de 0 a 600 µg/mL.

## 8. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA CONFRONTACIÓN *Trichoderma* spp.-*Verticillium dahliae*

### 8.1. Diseño de ‘microarray’

El ‘microarray’ de *Trichoderma* utilizado en este trabajo fue de diseño propio y construido por Roche-NimbleGen, usando secuencias FASTA de los genomas tres genomas anotados y disponibles *online*: *T. atroviride* [<http://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.info.html>], *T. virens* [<http://genome.jgi.psf.org/Trive1/Trive1.home.html>], *T. reesei* [<http://genome.jgi.psf.org/Trire2/Trire2.home.html>]. Este *microarray* constó de 385.000 sondas 60-mer, englobando 11.643 genes de *T. atroviride* IMI 306040, 11.000 genes de *T. virens* Gv29-8 y 9.129 genes de *T. reesei* QM6a.

### 8.2. Hibridación con sondas

El ARN purificado de cada una de las tres situaciones de estudio consideradas se remitió a Roche-Nimblegen (1 µg/ml). Esta compañía realizó la síntesis de los ARNc, el marcaje, la hibridación y la captura de señales. Se hibridaron, separadamente, tres ‘chips’ con 15 µg de ARNc fragmentado y marcado para cada una de las tres condiciones biológicas consideradas. Para llevar a cabo estas hibridaciones, se utilizó un sistema compuesto por un horno de hibridación (permite realizar la hibridación de un gran número de ‘chips’ de manera simultánea), una unidad de procesamiento (realiza el proceso de lavado de los ‘chips’), y un láser.

### 8.3. Detección y análisis de los datos

La digitalización de las señales de fluorescencia emitidas después de la hibridación se realizó con el escáner Axon GenePix 4000B, utilizando el programa ‘NimbleScan 2.3’. Posteriormente, se procesó la intensidad de señal de los juegos de sondas de cada gen para los nueve lotes de datos, obtenidos de las tres réplicas realizadas de las condiciones NV, OV y CON.

Para el cálculo de la señal de expresión por juego de sondas en el ‘microarray’, se empleó el algoritmo ‘Robust Microarray Analysis’ (RMA) (Irizarry y col., 2003) que incluye tres pasos: corrección de la interferencia de fondo (‘background’), normalización por cuantiles y cálculo sumariado de la señal por juego de sondas.

Para identificar los juegos de sondas que mostraron diferencias significativas en el nivel de expresión en el ‘microarray’ se utilizó el algoritmo ‘Significance Analysis of Microarrays’ (SAM) (Tusher y col., 2001), utilizando un ‘Fold change’ (FC) > 2 y un  $P < 0,05$ , y un umbral de ‘False Discovery Rate’ (FDR) de 0,15 (Benjamini y Hochberg, 1995). El análisis se realizó utilizando el ‘software’ R del programa ‘FlexArray’ 1.6.1.1. Los transcritos que mostraron un cambio de expresión significativo se anotaron según la terminología ‘Gene Ontology’ (GO) (Ashburner y col., 2000). Y, por último, se realizó

un análisis de enriquecimiento de términos GO, utilizando las herramientas disponibles en la página de AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>) y un FDR < 0,15, con objeto de saber qué categorías GO estaban sobrerrepresentadas en cada una de las situaciones experimentales consideradas en el estudio. Todas las proteínas con función desconocida se sometieron a una búsqueda por homología de secuencia aminoacídica mediante el algoritmo BLASTP y aplicando un nivel de ‘E-value’ <  $10^{-20}$ , con objeto ampliar el campo de búsqueda de función a otros organismo diferentes a las tres especies de *Trichoderma* utilizadas en la generación del ‘chip’.

Los datos obtenidos, correspondientes a la inducción o represión de genes en las tres condiciones de cultivo consideradas, se depositaron en la base de datos ‘Gene Expression Omnibus’ (GEO) con el número de acceso GSE66835.

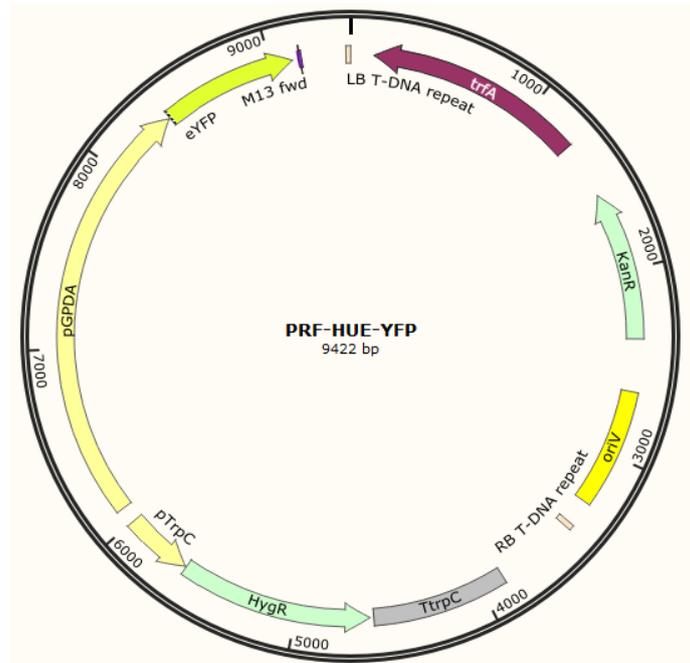
## 9. TRANSFORMACIÓN DE ORGANISMOS

### 9.1. Construcción del vector de expresión de eYFP

El vector pRF-HUE-YFP (9422 pb) (Fig. 9) se construyó a partir del plásmido pRF-HUE (Fradsen y col, 2008), mediante la inserción de un fragmento de 721 pb del gen que codifica la proteína fluorescente eYFP.

El fragmento de 721 pb corresponde a un amplicón obtenido mediante PCR, tomando como molde ADN plasmídico obtenido a partir de transformantes de *E. coli* que llevan el plásmido gYFP, con oligonucleótidos diseñados sobre la región codificante del *eYFP*. Dichos oligonucleótidos contenían en su extremo 5’ nueve pares de bases adicionales, siendo una de ellas una uridina reconocible por la enzima USER (‘Uracil-Specific Excision Reagent’) que generaba extremos cohexivos a partir de la uridina. Los extremos homólogos al inserto en el plásmido pRF-HUE se generaron utilizando las enzimas de restricción *PacI* y *Nt.BbvCI* (BioLabs).

Posteriormente, el plásmido digerido y el amplicón mellado se transformaron simultáneamente en *E. coli*, donde se produjo la ligación final.



**Figura 9.** Vector de transformación pRF-HUE-YFP.

## 9.2. Transformación de *Escherichia coli*

### 9.2.1. Preparación de células competentes

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

1. Se realizó una siembra en estría en medio LB agar de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se incubó durante 16 h a 37°C.
2. De esta placa inicial, se cogieron 5 colonias aisladas y se utilizaron para inocular un matraz de 2 L con 250 mL de medio SOC, que se incubó durante 20 h, aproximadamente, a 25°C y 200 rpm, hasta alcanzar una D.O. de 0,6 unidades a 600 nm.
3. El cultivo se mantuvo en hielo durante 10 min y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C.
4. El precipitado se resuspendió en 40 mL de tampón TB frío y se mantuvo en hielo durante 10 min.
5. Se centrifugó nuevamente, en las mismas condiciones, y las células se resuspendieron en 20 mL de tampón TB frío.
6. Se añadieron 1,4 mL de DMSO (concentración final al 7%) y se mantuvo durante 10 min en hielo.
7. Se prepararon alícuotas que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

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

### 9.2.2. Transformación de células DH5α

La transformación de células competentes de *E. coli* DH5α se realizó mediante “choque térmico”, siguiendo el método descrito por Hanahan (1983) y modificado por Inoue y col. (1990). El protocolo de transformación se detalla a continuación:

1. Se descongelaron las células competentes en hielo entre 10 y 15 min.
2. Se incubaron en hielo, durante 30 min, 50 µL de esas células competentes junto con 10 µL (350 ng aproximadamente) del ADN plasmídico de interés o agua ultrapura estéril (control negativo).
3. Posteriormente se sometieron a un choque térmico, 42°C durante 45 o 60 s y la muestra se mantuvo en un baño de hielo durante 2 min.
4. Se añadieron 450 µL de medio LB, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó a 300 rpm durante 90 min a 37°C.
5. Se sembraron 100 µL de la transformación por extensión sobre una placa Petri con medio sólido LB suplementada con kanamicina (50 µg/mL).
6. El resto de la transformación se centrifugó a 2.300 x g y temperatura ambiente durante un 1 min, se retiró el sobrenadante, y el precipitado, tras resuspenderlo en 10 µL de LB, se sembró en medio sólido tal cual se indica en el punto anterior.
7. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche (entre 16 y 20 h).
8. Las colonias crecidas en las placas Petri se escrutaron mediante PCR.

## 9.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

### 9.3.1. Preparación de células electrocompetentes

Se siguió el protocolo propuesto por Mozo y Hooykass (1991), con ligeras modificaciones que se detallan a continuación.

Se inoculó una colonia de *A. tumefaciens* AGL1 en 100 mL de LB suplementado con rifampicina (25-50 µg/mL) y carbenicilina (100-200 µg/mL), y se incubó a 200 rpm y 28°C de 12 a 16 h.

Las células se lavaron, tres veces, con glicerol al 10% frío por centrifugación a 5.000 rpm y 4°C durante 5 min.

Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol al 10% frío y se hicieron alícuotas de 40 µL que se mantuvieron a -80°C.

### 9.3.2. Electroporación

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* AGL1 se realizó mediante electroporación siguiendo el método de Mullins y col. (2001).

1. Las células competentes se descongelaron lentamente en hielo, y se mezclaron entre 50 y 200 ng de DNA con 40  $\mu$ L de células.
2. La suspensión se colocó en una cubeta de electroporación (Bio-Rad) de 0,1 cm, previamente enfriada, se utilizó un pulso de 8 a 12 ms, 2.5 kV, 25 $\mu$ FD y 400 Ohms, y la muestra se recuperó con 1 mL de LB.
3. Posteriormente, la mezcla se incubó a 150 rpm entre 2 y 4 h a 28°C, y se sembraron 100  $\mu$ L de la misma, por extensión en placas de LB suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/mL), rifampicina (25  $\mu$ g/mL) y carbemicilina (100  $\mu$ g/mL).
4. Los 900  $\mu$ L de mezcla restantes se centrifugaron a 7.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente y el precipitado resultante se resuspendió en 50  $\mu$ L de LB, que se sembraron por extensión en placas de LB suplementado con antibióticos como se indica en el punto anterior.
5. Los transformantes se seleccionaron tras una incubación de las placas a 28°C durante 2 días.

### 9.3.3. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* para la infección del hongo

La transformación de los hongos se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Mullins y col. (2001) con ligeras modificaciones.

1. Se sembró la estirpe de *A. tumefaciens* AGL1 que contiene el vector de interés en 2 mL de MM suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/mL), y se incubó a 28°C y 200 rpm durante 2 días en oscuridad. En este tiempo, el cultivo alcanza una D.O. a 600 nm igual o superior a 1,5.
2. Tras realizaron diluciones con MM hasta obtener una D.O. a 600 nm de 0,15, se cogieron 200  $\mu$ L y se añadieron a 1,8 mL de MI que contenía acetosiringona 100 mM. La acetosirningona es el compuesto que activa los genes de virulencia de *A. tumefaciens*.
3. Por último, la mezcla se incubó en oscuridad a 28°C y 200 rpm durante 6 h.

### Infección del hongo con *Agrobacterium tumefaciens*

1. Se mezclaron 100  $\mu$ L del cultivo de la bacteria, obtenido como se describe en el apartado anterior, con 100  $\mu$ L de esporas del hongo a una concentración de 10<sup>6</sup> esporas/mL.
2. La mezcla anterior se extendió sobre una membrana de nitrocelulosa (0,45  $\mu$ M de poro) situada en una placa que contenía medio de cocultivo, que se incubó en oscuridad a 25°C durante 2 días.
3. Posteriormente, se transfirió la membrana, cortada en cuatro, al medio de selección, PDA con higromicina B (75  $\mu$ g/mL) y cefotaxima 200  $\mu$ M (inhibe el crecimiento de *A. tumefaciens*), y se incubó a 25°C hasta la aparición de colonias, entre 7 y 10 días.
4. Las colonias resultantes se transfirieron, individualmente, a placas de PDA suplementado con higromicina B (50  $\mu$ g/mL) y cloranfenicol (300  $\mu$ g/mL).

5. Se aislaron monospóricos, con ayuda de un estereomicroscopio y un bisturí, que se crecieron en medio AA, y se comprobó que eran transformantes por microscopía confocal.
6. Posteriormente, se hicieron tres pases alternando siembras en PDA suplementado con higromicina B (50 µg/mL) y en PDA, para comprobar la estabilidad mitótica.
7. Por último, se recogieron esporas que se conservaron en glicerol al 15% a -80°C.

## **10. ENSAYOS *in vitro* DE ANTAGONISMO ENTRE HONGOS FILAMENTOSOS**

### **10.1. Ensayos de antagonismo en cultivos duales**

Las cepas *T. atroviride* T11, *T. asperellum* Bt2, Bt3 y T25 y *T. gamsii* Bt1 se enfrentaron a estirpes de *V. dahliae* (V-1254I, V-1558I, V-136I, V-138I, V-1305I y V-1383I) en cultivos duales. Para cada enfrentamiento, se colocó un cilindro de agar de 0,5 cm de diámetro procedente de una colonia en crecimiento activo de *V. dahliae*, en una placa Petri que contenía medio PDA, a 1,5 cm del borde, y 4 días más tarde, se colocó a 5,5 cm de separación del inóculo anterior, un cilindro de 0,5 cm de diámetro procedente de un cultivo de *Trichoderma*, y la placa se incubó a 22°C durante 11 o 12 días. En paralelo, se realizaron cultivos individuales de cada uno de los patógenos, que fueron los controles del experimento. Cada uno de los enfrentamientos se llevó a cabo por triplicado. Y al final del ensayo, se midieron los diámetros de las diferentes colonias y las placas se fotografiaron, anotando en cada caso, si la cepa de *Trichoderma* spp. rodeaba o sobrecrecía la colonia de *V. dahliae*.

### **10.2. Ensayos de antagonismo en cultivos duales en medio discontinuo**

Esta técnica se basa en el enfrentamiento de dos hongos en un medio sólido sin permitir que ocurra contacto entre ellos con objeto de determinar si, a través de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), ocurre inhibición del crecimiento de los mismos.

Los cultivos se realizaron en placas de 15 cm de diámetro que contenían medio PDA y a las que se había retirado previamente y en condiciones estériles, una banda longitudinal de 2,5 cm de anchura en el centro de cada placa. Se realizaron dos condiciones de estudio para el patógeno, inoculándolo 4 días antes que T11 o realizando el enfrentamiento el mismo día. En el primer caso, se colocó un cilindro de agar de 0,5 cm de diámetro, procedente de una colonia de crecimiento activo de V-138I y las placas se incubaron a 25°C durante 4 días. Pasado este tiempo, las placas que contenían la colonia del patógeno se inocularon a 9 cm de separación con un cilindro de agar de 0,5 cm de diámetro, procedente de una colonia de crecimiento activo de la cepa T11. En el segundo caso las placas se inocularon V-138I y T11 al mismo tiempo. En paralelo se sembraron los correspondientes controles: placas con agua (10 µL) frente a T11, y

placas con T11 frente a T11. Todas las placas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 12 o 24 días y, posteriormente se fotografiaron. Para los enfrentamientos T11-T11, la cepa se inoculó en las dos posiciones de la placa al mismo tiempo. Cada uno de los enfrentamientos se llevó a cabo por triplicado.

### 10.3. Ensayos de antagonismo mediante el uso de membranas

Se sembraron discos de micelio de 0,5 cm de diámetro de las cepas de *T. atroviride* T11 y *T. asperellum* Bt3 y T25 en el centro de las placas de PDA, sobre una membrana de celofán (permiten la difusión de proteínas de hasta 90 kDa) o una membrana de celulosa de 14 kDa de tamaño de poro (Sigma) (previenen la difusión de macromoléculas), y se incubaron a 22°C durante 48 h. Pasado ese tiempo, se retiraron las membranas, y se sembró el disco de micelio de 0,5 cm de diámetro del patógeno *V. dahliae* V-138I. En paralelo, se crecieron los patógenos en placas de PDA donde previamente no se había crecido *Trichoderma* y se utilizaron como controles. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 8 días. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados muestran el porcentaje de inhibición de las colonias de *V. dahliae*.

## 11. ENSAYOS *in vivo* OLIVO-*Trichoderma* spp.-*Verticillium dahliae*

### 11.1. Capacidad de *Trichoderma* spp. para controlar VO

Se realizaron ensayos *in vivo* para evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. en el desarrollo de la VO, utilizando las cepas Bt3, T11 y T25 de *Trichoderma* spp., el aislado V-138I de *V. dahliae* y plantones de olivo de 4 meses de edad de la variedad Picual, que es altamente susceptible al aislado V-138I D.

El inóculo de V-138I se obtuvo multiplicando este patógeno en una mezcla de harina de maíz y arena (CMS, harina de maíz:arena:agua desionizada, 9:1:2, p/p) (Nene y Haware, 1980). Para ello, se inocularon matraces que contenían 400 g de CMS, autoclavado dos veces a 121°C durante 1,5 h, con 10 discos de 0,5 cm de diámetro procedentes del borde de la colonia de un cultivo de 7 días en medio PDA, y se incubaron a 25°C en oscuridad durante 4 semanas. El cultivo de V-138I en CMS se homogeneizó y se mantuvo a 33°C durante 3 días, para su secado. Posteriormente, se añadió a una mezcla pasteurizada de suelo franco arcilloso: turba, 2:1 (v/v), con pH 8,4 y una capacidad de retención del agua del 24%, a una proporción aproximada del 3%, hasta alcanzar una densidad de  $1,3 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (ufc) por g de suelo, calculando ésta mediante la siembra de distintas diluciones seriadas en medio semiselectivo NP-10 (Kabir y col., 2004). A esta mezcla se la denominó “mezcla de suelo infestado con V-138I”.

Para las cepas *Trichoderma* spp. se obtuvieron dos tipos de inóculo. Uno consistió en recoger conidias a partir de cultivos de 7 días en PDA. La recogida de las conidias se

realizó según se describe en el apartado 4.3 de esta sección, y su concentración se ajustó, con agua estéril, a  $1 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ . El otro tipo de inóculo, el que se aplicó al suelo, se obtuvo de una forma similar a como se ha descrito en el párrafo anterior para V-138I, pero utilizando una mezcla de salvado de trigo, harina de maíz y arena [WCMS, arena:salvado de trigo-arena de maíz (1:1, p/p):agua desionizada, 9:1:2, p/p] que se inoculó con 6 discos de un cultivo en PDA y se incubó durante 2 semanas. Y, posteriormente, a la mezcla de WCMS infectada con *Trichoderma* spp., se añadió la mezcla de suelo pasteurizado descrita anteriormente para V-138I, hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^7$  cfu por g de suelo, determinada mediante la siembra de distintas diluciones seriadas en medio selectivo (Elad y col., 1981).

La inoculación de los plántones de olivo con Bt3, T11 y T25 se realizó trasplantándolos, individualmente, a macetas de plástico desinfectadas de 0,9 L (9x9 x11 cm) que contenían: i) suelo mezclado con el WCMS infestado, o ii) suelo mezclado con WCMS estéril y regado, primero, con 60 mL de una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  de *Trichoderma* spp., por planta, y luego con 20 mL de agua estéril, para conseguir una dispersión homogénea de las conidias a través de todo el perfil del suelo. Para las plantas control, no se incorporó inóculo de *Trichoderma* spp. Todas las plantas se incubaron en una cámara de crecimiento ajustada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa del 60 al 80% y con un fotoperiodo de  $14 \text{ h día}^{-1}$  de luz fluorescente de  $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , durante 2 semanas.

Posteriormente, las plantas se sacaron cuidadosamente de las macetas y se trasplantaron, individualmente, a una maceta de 1,5 L (11x11x13 cm) que contenía la mezcla de suelo infestado con V-138I o no, su correspondiente control. Dichas plantas se incubaron durante 10 semanas en una cámara de crecimiento bajo las condiciones antes descritas, las cuales son óptimas para la infección de *V. dahliae* y el desarrollo de la enfermedad en los plántones de olivo (Calderón y col., 2014).

El experimento tuvo un diseño factorial de tres elementos: tratamiento con *Trichoderma* spp. (Bt3, T11, T25), método de aplicación de *Trichoderma* spp. (suelo, riego) y inoculación del V-138I (inoculado, no inoculado). Se utilizaron 10 plantas por tratamiento, dispuestas completamente al azar. El experimento duró 12 semanas y se repitió dos veces. Los riegos se realizaron según necesidad, y las plantas se fertilizaron cada 7 días con 50 mL de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950).

La reacción de enfermedad en las plantas se siguió por la incidencia (porcentaje de plantas que muestran síntomas de la enfermedad) y la severidad de los síntomas en hoja. Los síntomas se valoraron en cada planta de acuerdo a una escala de 0 a 4, basada en el porcentaje de hojas y brotes afectados, y que se detalla a continuación: 0= sin síntomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-100% y 4 = muerte de la planta (Mercado-Blanco y col. 2004). Los síntomas fueron seguidos semanalmente durante las 12 semanas del ensayo. Los datos de la severidad de los síntomas a lo largo del tiempo se representaron en una gráfica para obtener la curva de progreso de severidad de la VO, y se calculó el área

estandarizada bajo la curva de progreso de la enfermedad en días (SAUDPC) mediante el método de integración trapezoidal (Madden y col., 2007).

Una vez terminado el experimento, las plantas se cortaron a nivel del suelo y se midió el tallo principal de cada una de ellas. Paralelamente, se determinó en cada planta la infección de V-138I mediante un reaislamiento del patógeno. Para ello, se cortaron cuatro segmentos de 1 cm, representativos de la longitud del tallo, por planta, que se lavaron con agua y se les eliminó la corteza en condiciones asépticas. Después, los trozos de tallo sin corteza, se sumergieron en 0,5% de NaClO durante 1,5 min, se lavaron dos veces con agua estéril y se colocaron en una placa que contenía medio PDA. Estos cultivos se incubaron a 25°C en oscuridad durante 7 días. La confirmación de la presencia de *V. dahliae* se realizó mediante la observación al microscopio de conidióforos dispuestos en verticilos y microescleroios en las colonias crecidas en las plantas (Inderbitzin y col., 2011).

### **11.2. Colonización de la rizosfera del olivo por *Trichoderma* spp.**

Para determinar la presencia de *Trichoderma* en la rizosfera de las plantas de olivo y su capacidad para colonizar endofíticamente su raíz, se utilizaron cuatro plantas, tomadas al azar, del ensayo detallado en el apartado 11.1 de esta sección. Para cada tratamiento (Bt3, T11, T25, no inoculada) y forma de aplicación (suelo, riego), se realizaron recuentos a las 2 y/o 12 semanas de aplicar el antagonista.

Los plantones se sacaron delicadamente de las macetas, se agitaron suavemente para eliminar la mayor cantidad de tierra posible del cepellón y se cortaron segmentos de raíz de 1 cm de longitud. Para cada planta, se partió de 1 g de segmentos de raíz, que se lavaron con 20 mL de agua destilada durante 10 min y, después, se sonicaron durante 10 min. Se prepararon diluciones seriadas del líquido de lavado y se plaquearon en medio selectivo de *Trichoderma* spp. (Elad y col., 1981), incubando las placas como se describe anteriormente. Las poblaciones de *Trichoderma* se expresaron como cfu g<sup>-1</sup> de tejido fresco de raíz.

Para determinar la incidencia de la colonización endofítica de la raíz en plantas de olivo inoculadas con *Trichoderma* spp., se cogieron, 2 semanas después de aplicar el antagonista, 12 raíces de cada una de las cuatro plantas procedentes de los distintos tratamientos mencionados anteriormente. Las raíces se desinfectaron mediante sucesivos lavados, uno en etanol al 75% durante 3 min, uno en NaClO al 1,5% durante 5 min y, por último, dos en agua estéril; se dejaron secar, dentro de una campana de flujo laminar, sobre papel de filtro estéril durante 10 min y se cortaron en segmentos de 1,5 cm. Los segmentos de raíz se dispusieron en placas que contenían medio selectivo de *Trichoderma* spp. (Elad y col., 1981), las cuales se incubaron a 25°C en oscuridad durante 7 días. Los resultados se expresaron como porcentaje de segmentos de raíz que produjeron colonias de *Trichoderma* spp.

### 11.3. Ensayos para estudiar mediante confocal el proceso de infección y colonización de olivo por *Verticillium dahliae*

Con objeto de estudiar la infección y colonización de *V. dahliae* en olivo, tratado o no con *Trichoderma* spp., mediante microscopía confocal, se realizaron ensayos *in vivo* con los transformantes V138-Yh y GFP22 y plántones de olivo de 3 meses. En estos ensayos se utilizó como material vegetal de olivo la variedad Picual y los clones de acebuche Ac-4, Ac-15 y Ac-18, con distinta susceptibilidad al patógeno.

El inóculo de *T. harzianum* GFP22 consistió en conidias producidas en cultivos en PDB, incubados en agitación a 150 rpm y  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo de 12 h día<sup>-1</sup> de luz fluorescente de  $180\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ , durante 1 semana. La densidad de la suspensión se ajustó a  $1 \times 10^7$  conidias mL<sup>-1</sup> con agua estéril.

Como inóculo de *V. dahliae* V138-Yh se utilizaron conidias producidas en cultivos del hongo en PDB incubados en agitación a 150 rpm y  $24\pm 1^\circ\text{C}$ , en oscuridad, durante 7 días. La densidad de la suspensión se ajustó a  $2,5 \times 10^6$  conidias mL<sup>-1</sup> con agua estéril, y la viabilidad de las conidias se determinó sembrando, alícuotas de diluciones seriadas (cuatro placas por dilución), en medio AA, e incubando las placas bajo las condiciones antes indicadas.

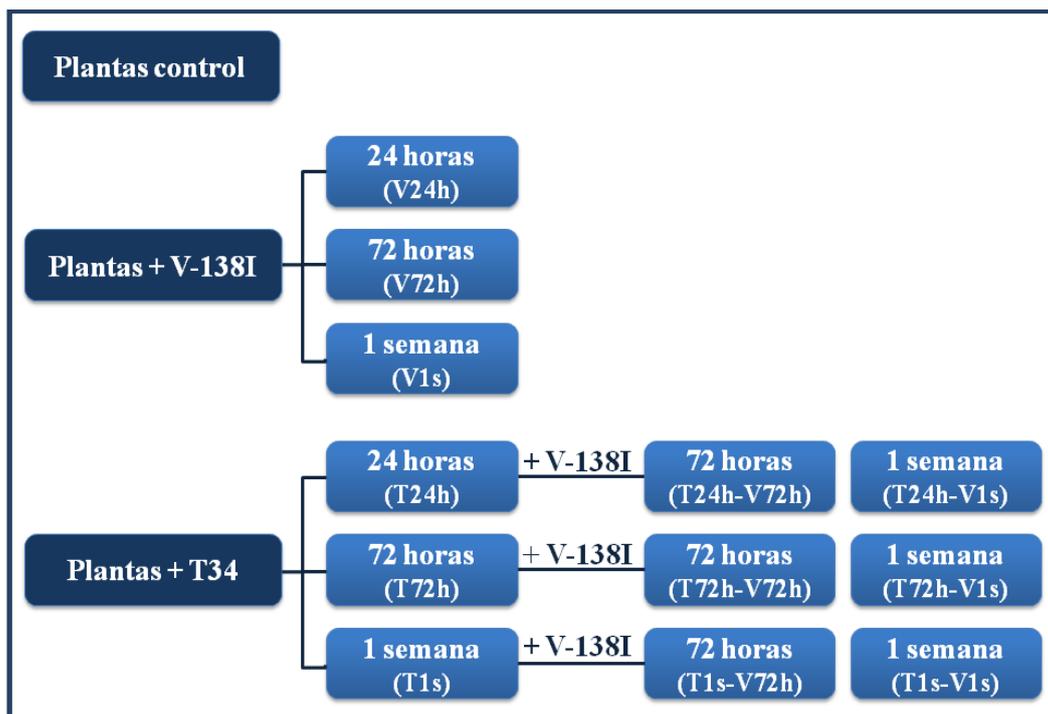
Las plantas se inocularon con GFP22 aplicando, primero 1/3 de la suspensión de conidias mediante pulverización del sistema radical desnudo y no herido intencionadamente, y 2/3 de la misma mediante riego. Como controles se trataron plantas similarmente a las inoculadas, excepto por la ausencia de inóculo de GFP22. Las plantas inoculadas y control se incubaron durante 12 días en una cámara de crecimiento, bajo las condiciones descritas en el apartado 11.1 de esta sección. Posteriormente, se realizó la infestación con el patógeno mediante trasplante, sin alterar el cepellón, a una maceta de mayor tamaño y rellenando el hueco alrededor del sistema radical con arena-limo (2:1, v/v) que contenía  $2,5 \times 10^6$  conidias mL<sup>-1</sup> de V138-Yh. Como controles se utilizaron plantas tratadas con agua estéril en lugar de inocular con GFP22 y/o el V138-Yh. Las plantas inoculadas y control se incubaron, en la cámara de crecimiento, durante 4 meses. Se regaron según necesidad y se fertilizaron cada 14 días con 50 mL de solución nutritiva Hoagland.

Se utilizaron 10 plantas por tratamiento (V138-Yh, GFP22, V138-Yh +GFP22, control). De ocho plantas se tomaron diariamente muestras de raíz, tallo y rama, hasta 43 días después de aplicar el patógeno, para su observación mediante microscopía confocal. Por otro lado, de dos plantas de cada tratamiento, se tomaron muestras de tallo y de hoja, de un tamaño de 0,5 a 1 cm de longitud, para ser utilizadas en los aislamientos del patógeno. Para ello se utilizaron 24 fragmentos de tallo por sección, tomados de 3 secciones diferentes del tallo (alta, media y baja), y 30 fragmentos de hoja, procedentes de cinco hojas por sección y de tres secciones diferentes (alta, media y baja), se desinfectaron como se indicó en el apartado 11.2 de esta sección y se dispusieron en placas conteniendo medio PDA, que se incubaron como se describe

anteriormente. Los resultados se expresaron como porcentaje de colonias de patógeno obtenidas a partir de muestras de tallo y de hoja.

#### 11.4. Ensayos para estudiar la señalización de defensa en planta

Para los estudios de señalización de repuestas de defensa en planta de olivo se realizó un ensayo *in vivo* similar al que se describe en el apartado 11.3 de esta sección pero utilizando el aislado V-138I de *V. dahliae*, la cepa *T. harzianum* T34 y como material vegetal los clones de acebuche Ac-4 y Ac-15. El inóculo de T34 se obtuvo y se aplicó del mismo modo a como se describe en el apartado anterior. En el caso de V-138I, el inóculo se obtuvo como se ha descrito antes, pero se aplicó mediante inmersión del sistema radical durante 20 min en una suspensión conidial ajustada a  $1 \times 10^7$  conidias mL<sup>-1</sup> y, posteriormente, trasplantando a macetas de 1,5 L que se rellenaron con una mezcla turba rubia:turba negra (1:1 v/v), previamente autoclavada dos veces a 121°C durante 1,5 h. Ya en los análisis mediante qPCR se utilizaron muestras de raíz y hoja de plantas tratadas o no con T34 y/o V-138I a diferentes tiempos, para ambos hongos, a continuación se detalla cada tratamiento, en cuanto a cepas usadas, tiempos de inoculación y recogida de las muestras. En el ensayo se incluyeron 52 plantas de “Ac-4” y 52 plantas de “Ac-15”, y se utilizaron cuatro plantas de cada clon por tratamiento considerado. La identificación de las muestras incluidas en el análisis por qPCR se presenta en la Fig. 10: control, plantas no tratadas con T34 o V-138I; V24h, 24 h tras aplicar V-138I; V72h, 72 h tras aplicar V-138I; V1s, 1 semana tras aplicar V-138I; T24h, 24 h tras aplicar T34; T72h, 72 h tras aplicar T34; T1s, 1 semana tras aplicar T34; T24h-V72h, 72 h tras aplicar V-138I en plantas en las que 24 h antes se había aplicado T34; T24h-V1s, 1 semana tras aplicar V-138I en plantas en las que 24 h antes se había aplicado T34; T72h-V72h, 72 h tras aplicar V-138I en plantas en las que 72 h antes se había aplicado T34; T72h-V1s, 1 semana tras aplicar V-138I en plantas en las que 72 h antes se había aplicado T34; T1s-V72h, 72 h tras aplicar V-138I en plantas en las que 1 semana antes se había aplicado T34; y T1s-V1s, 1 semana tras aplicar V-138I en plantas en las que 1 semana antes se había aplicado T34. Las muestras de hoja y raíz, una vez recogidas, se congelaron inmediatamente con ayuda de nitrógeno líquido, se liofilizaron durante 24 h y se utilizaron para extraer ARN como se indica en el apartado 5.3.3 de esta sección.



**Figura 10.** Esquema de tratamientos aplicados y recogida de muestras de plantas de acebuche para su análisis por qPCR.

## 12. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER

El seguimiento tanto de *T. harzianum* GFP22 como de *V. dahliae* V138-Yh en los plantones de olivo y acebuche, a diferentes tiempos de ensayo, se realizó mediante microscopía confocal láser, esta técnica permite la captación de imágenes de alta resolución de muestras fluorescentes y recoge la luz solamente de la parte de la muestra que se encuentra en el plano focal del objetivo del microscopio. Como el láser ilumina solo un área pequeña cada vez, escaneando la muestra entera, se pueden tomar imágenes de diferentes secciones ópticas y, al final, disponer de una imagen nítida en profundidad, no exclusivamente plana. Además, permite la reconstrucción de imágenes en tres dimensiones a partir de las secciones ópticas (Genre, 2008).

Las raíces, ramas y tallos de los olivos y acebuches se seccionaron longitudinalmente, en agua destilada, con ayuda de un vibratomo Series 1000plus (TAAB Laboratories Equipment, Aldermarston, Reino Unido), y transversalmente mediante un microtomo manual Nahita modelo 501.

Se realizaron cortes transversales y longitudinales de entre 100 y 250  $\mu\text{m}$  de raíces y tallos de plantones de olivo o acebuche con 4 o 6 meses de edad, que se montaron sobre portas con glicerol al 50% (v/v) y se observaron directamente en el microscopio confocal láser (TCS2-SP2, Leica Microsystems, Alemania). La excitación se proporcionó a través de un láser de argón-criptón (488 nm) y se utilizaron unas longitudes de onda de excitación y emisión para detectar la fluorescencia de 495-520

nm para la eGFP ('Enhanced Green Fluorescent Protein') y de 530-620 nm para la eYFP ('Enhanced Yellow Fluorescent Protein'), respectivamente. Las imágenes se visualizaron con los objetivos 10x y 20x y se adquirieron con el 'LSM Image Browser software' (Leica).

### 13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos *in vitro* se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre ellos. Cuando se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se aplicó el test de comparación múltiple de Tukey- 'Honestly Significant Difference' (HSD), del programa 'Statistix' versión 8.0 para Windows, que determina entre que tratamientos se presentan dichas diferencias. Los datos obtenidos en los ensayos *in vivo*, en los que se evalúa la capacidad de *Trichoderma* spp. para controlar la VO causada por V-138I y para colonizar la rizosfera de olivo "Picual", se sometieron a un ANOVA aplicando el método de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

### 14. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y 'SOFTWARE' UTILIZADOS

#### 14.1. Búsqueda de secuencias similares en bases de datos

La búsqueda de homología de secuencias de interés con otras depositadas en bases de datos se realizó utilizando el algoritmo 'Basic Local Alignment Search Tools' (BLAST). Este algoritmo constituye una colección de diferentes programas que permiten distintas combinaciones entre ácidos nucleicos y proteínas, sean estos las secuencias problema o de las bases de datos de secuencias. Lleva a cabo alineamientos de tipo local entre una secuencia desconocida y una base de datos. Las mayores ventajas de BLAST son su gran velocidad y la evaluación estadística que realiza de los resultados. El parámetro estadístico correspondiente al valor  $E$  se calcula en función de que un alineamiento ocurra por azar. Por ejemplo, si tenemos un valor  $E$  igual a 0, significa que la probabilidad de que ese alineamiento haya ocurrido por azar es 0.

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

## 15. PROVEEDORES COMERCIALES

**Agilent Technologies:** Santa Clara, CA, EE.UU. ([www.agilent.com](http://www.agilent.com)).

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

**BioLabs:** New England BioLabs, Hitchin, Reino Unido ([www.neb.uk.com](http://www.neb.uk.com)).

**Bio-Rad:** Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU. ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)).

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

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

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

**Favorgen:** Favorgen Biotech Corp., Ping Tung, Taiwan (<http://www.favorgen.com>).

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

**Leica:** Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania ([www.leica-micosystems](http://www.leica-micosystems)).

**Life Technologies:** Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU. ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

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

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

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

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

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

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

# RESULTADOS

---





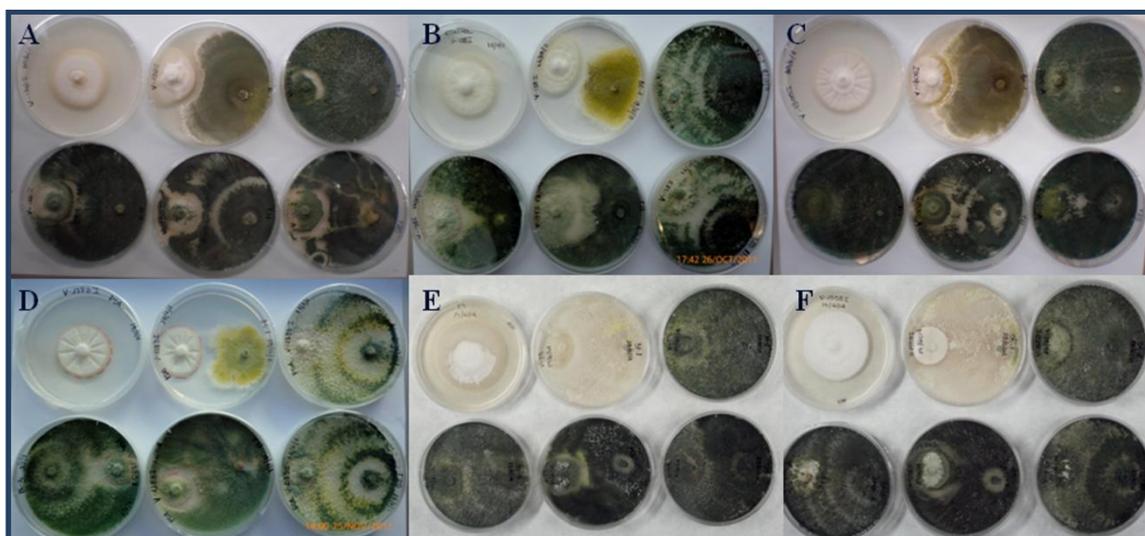


## 1. SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. frente a *Verticillium dahliae*

### 1.1. Antagonismo en cultivo dual

Para evaluar la capacidad antagonista de cinco cepas de *Trichoderma* spp. (Tabla 3) frente a ocho cepas de *V. dahliae* (Tabla 4) se realizaron cultivos duales de ambos hongos enfrentados en una placa Petri, según se describe en el Apartado 10.1 de Materiales y Métodos.

Los resultados de este ensayo *in vitro* mostraron que todas las cepas de *Trichoderma* spp., excepto *T. gamsii* Bt1, son capaces de sobrecrecer la colonia de las diferentes cepas de *V. dahliae*. Una imagen de los cultivos duales para las cinco cepas de *Trichoderma* spp. frente a seis de las ocho cepas de *V. dahliae* utilizadas se muestra en la Fig. 11.



**Figura 11.** Cultivos duales de *Trichoderma* spp. y *V. dahliae* en medio PDA tras 12 días a 25°C. La cepa de *Trichoderma* spp. fue inoculada 4 días después que la cepa de *V. dahliae*. Las letras A a F representan las diferentes cepas de *V. dahliae*: A, V-136I; B, V-138I; C, V-1305I; D, V-1383I; E, V-T9, todas ellas D, y F, V-1558I (ND). A su vez, en cada subgrupo de seis placas, la localización de las cepas es como sigue: solo *V. dahliae* (control), *T. gamsii* Bt1 y *T. asperellum* Bt2 (arriba, de izquierda a derecha), y *T. asperellum* Bt3, *T. atroviride* T11 y *T. asperellum* T25 (abajo, de izquierda a derecha).

Tras 12 días de incubación a 25°C, se midió el área de la colonia de las diferentes cepas de *V. dahliae* que habían crecido solas (control), o enfrentadas a una cepa de *Trichoderma* spp. La diferencia en el tamaño de la colonia de *V. dahliae* entre las placas con cultivo dual y las placas control, expresada en porcentaje, se muestra en la Tabla 8. Para todas las cepas de *V. dahliae*, el mayor tamaño de colonia se observó en las placas control. Sin embargo, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el potencial antagonista de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. frente a seis de las ocho cepas de *V. dahliae* ensayadas (V-136I, V-138I, V-1305I, V-1383I, V-1477I y V-

1900I). En las confrontaciones frente a estas seis cepas, *T. gamsii* Bt1 mostró significativamente el menor antagonismo *in vitro* frente a cinco de ellas, y esta cepa junto con *T. asperellum* Bt2 mostraron una capacidad para inhibir el crecimiento de la cepa D V-1305I significativamente menor que las cepas Bt3 y T25 de *T. asperellum* y T11 de *T. atroviride*.

Ya que las cepas Bt2, Bt3, T11 y T25 presentaron una similar capacidad antagonista para inhibir el crecimiento de al menos siete de las ocho cepas de *V. dahliae*, estas cuatro cepas de *Trichoderma* spp. se seleccionaron para su inclusión en ensayos posteriores.

**Tabla 8.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia de ocho cepas de *V. dahliae* por cinco cepas de *Trichoderma* spp. tras 12 días de cultivo en PDA a 25°C. La cepa de *Trichoderma* spp. se inoculó 4 días después que la cepa de *V. dahliae*.

<i>V. dahliae</i>	Cepas de <i>Trichoderma</i> spp.				
	Bt1	Bt2	Bt3	T11	T25
V-136I	40 ± 1,8 c	66 ± 3,7 a	58 ± 3,1 b	68 ± 1,3 a	66 ± 2,7 a
V-138I	25 ± 4,9 b	62 ± 6,7 a	56 ± 3,0 a	57 ± 1,2 a	59 ± 7,1 a
V-1305I	45 ± 3,0 b	50 ± 11,1 b	69 ± 2,2 a	73 ± 7,7 a	71 ± 0,4a
V-1383I	15 ± 4,7 b	71 ± 5,3 a	62 ± 4,6 a	65 ± 4,4 a	65 ± 3,6 a
V-1477I	25 ± 10,2 b	53 ± 3,54 a	50 ± 3,1 a	57 ± 1,3 a	55 ± 5,3 a
V-1900I	3 ± 1,7 b	40 ± 1,0 a	46 ± 6,9 a	48 ± 7,6 a	44 ± 7,7 a
V-T9	66 ± 1,2 a	66 ± 4,5 a	68 ± 1,0 a	68 ± 3,8 a	74 ± 2,8 a
V-1558I	68 ± 0,4 a	67 ± 2,9 a	68 ± 3,7 a	66 ± 2,6 a	71 ± 0,2 a

\*Los valores son media de tres réplicas. Dentro de una misma fila, valores seguidos por la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre ellos.

## 1.2. Actividad antagonista en cultivos sobre membrana

Con objeto de determinar el papel de metabolitos secretados por *Trichoderma* spp. en la capacidad antagonista contra *V. dahliae*, las cepas Bt2, Bt3, T11 y T25, seleccionadas previamente por su mayor efecto inhibitor del crecimiento del patógeno, en cultivo dual, se evaluaron frente a cinco cepas del mismo, de las cuales cuatro son del patotipo D y una del patotipo ND, en ensayos sobre membrana según se describe en el Apartado 10.3 de Materiales y Métodos. Se utilizaron dos tipos de membranas: a) celofán, con tamaño de poro de aproximadamente 90 kDa y permeable a todo tipo de proteínas y metabolitos; y b) membrana de diálisis de celulosa, con tamaño de poro de 14 kDa, que teóricamente solo es permeable a compuestos de bajo peso molecular.

Después de retirar las membranas de celofán o de celulosa que contenían el micelio de *Trichoderma* spp., se determinó el efecto de los compuestos totales secretados por las cepas antagonistas (membrana de celofán) o solo por las moléculas

con un peso molecular menor de 14 kDa (membrana de celulosa) en el crecimiento de *V. dahliae*.

La inhibición del crecimiento de las cinco cepas de *V. dahliae* en un medio donde previamente había crecido una cepa de *Trichoderma* spp. (Bt2, Bt3, T11 o T25), expresada en porcentaje respecto al crecimiento observado en sus controles respectivos, se encuentran recogidos en las Tablas 9 y 10.

Según los ensayos realizados sobre celofán (Tabla 9), los compuestos totales secretados por la cepa T11 de *T. atroviride* mostraron una inhibición del crecimiento de las cinco cepas de *V. dahliae* significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor que los secretados por Bt2, Bt3 y T25 de *T. asperellum*, excepto para la cepa V-138I donde no se observaron diferencias significativas entre el efecto de los compuestos totales de T11 y los de Bt3. A su vez, los compuestos secretados por T11 inhibieron completamente el crecimiento de una de las cuatro cepas D testadas, V-138I, y del ND V-1558I.

**Tabla 9.** Inhibición del crecimiento, expresado en porcentaje, de cinco cepas de *V. dahliae* por cuatro cepas de *Trichoderma* spp. en ensayos sobre membrana de celofán.

<i>V. dahliae</i>	Cepas de <i>Trichoderma</i> spp.			
	Bt2	Bt3	T11	T25
V-138I	41 ± 1,3 b	95 ± 4,7 a	100 ± 0,0 a	50 ± 2,4 b
V-1477I	43 ± 3,5 b	57 ± 2,6 b	77 ± 5,1 a	43 ± 1,5 b
V-1900I	28 ± 2,5 c	58 ± 1,4 b	100 ± 0,0 a	52 ± 1,2 b
V-T9	21 ± 1,9 d	46 ± 1,7 c	94 ± 5,7 a	63 ± 1,6 b
V-1558I	48 ± 0,3 b	46 ± 4,2 b	100 ± 0,0 a	52 ± 3,3 b

\*Los valores son media de tres réplicas y en una misma fila, valores seguidos por la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre ellos.

Los compuestos con un peso molecular de menos de 14 kDa secretados por la cepa T11 de *T. atroviride* también mostraron una inhibición más alta del crecimiento de las cinco cepas de *V. dahliae* que los secretados por las cepas Bt2, Bt3 y T25 de *T. asperellum*. A su vez, los metabolitos secretados por Bt2 presentaron, significativamente, menor capacidad para inhibir las cepas del patógeno en todas las combinaciones, con excepción de T25 sobre V-138I.

Los resultados presentados en la Tabla 10 indican que *V. dahliae* es muy sensible a compuestos de bajo peso molecular secretados por T11 y que, al menos en ensayos *in vitro*, esta cepa tiene el mayor potencial antagonista frente a *V. dahliae*.

**Tabla 10.** Inhibición del crecimiento, expresado en porcentaje, de cinco cepas de *V. dahliae* por cuatro cepas de *Trichoderma* spp. en ensayos sobre membrana de celulosa con tamaño de poro de 14 kDa.

<i>V. dahliae</i>	Cepa de <i>Trichoderma</i> spp.			
	Bt2	Bt3	T11	T25
<b>V-138I</b>	27 ± 1,3 b	74 ± 2,4 a	90 ± 10,0 a	34 ± 1,6 b
<b>V-1477I</b>	34 ± 3,0 c	58 ± 3,8 b	95 ± 4,6 a	56 ± 1,9 b
<b>V-1900I</b>	20 ± 1,6 c	48 ± 1,7 b	100 ± 0,0 a	51 ± 2,1 b
<b>V-T9</b>	20 ± 1,0 c	50 ± 10,4 a	76 ± 4,5 a	68 ± 2,2 ab
<b>V-1558I</b>	37 ± 0,5 c	72 ± 2,3 b	100 ± 0,0 a	90 ± 6,0 a

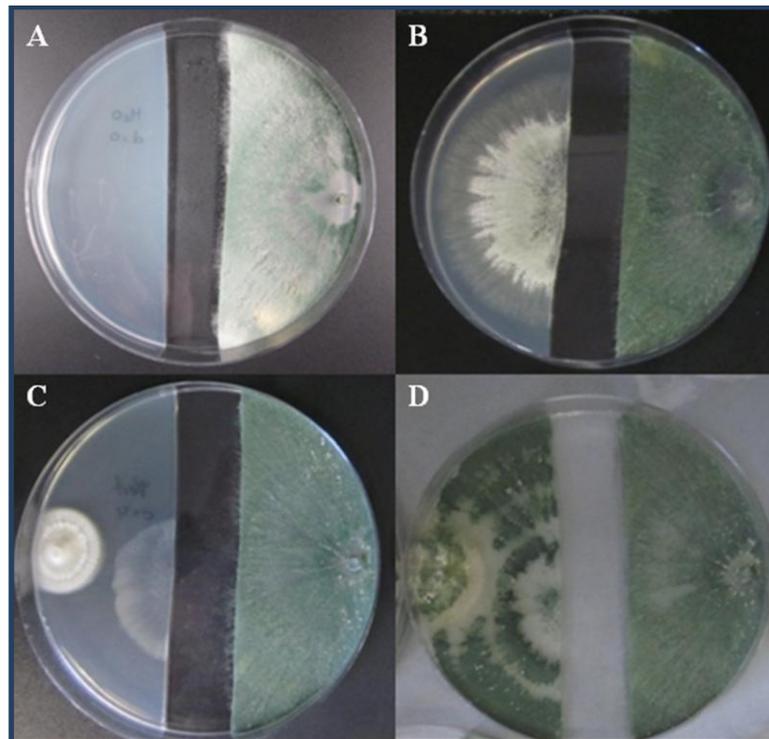
\*Los valores son media de tres réplicas y en una misma fila, valores seguidos por la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre ellos.

### 1.3. Antagonismo en cultivo dual en medio discontinuo

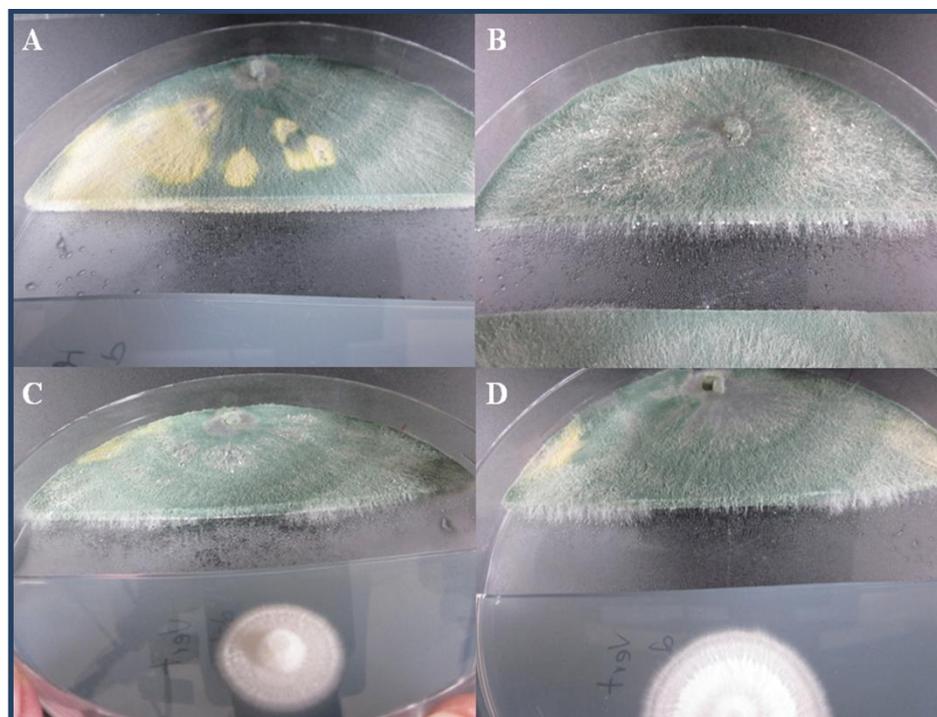
Para determinar si la alta actividad antagonista de *T. atroviride* T11 contra *V. dahliae* observada en ensayos llevados a cabo en cultivo dual y sobre membrana, es mediada por VOCs, la cepa T11 se enfrentó con la cepa V-138I en cultivo dual pero utilizando placas con discontinuidad en el medio de cultivo, según se describe en el Apartado 10.2 de Materiales y Métodos.

En dicho ensayo, la cepa T11 creció atravesando la franja sin medio en las placas, independientemente de que en el lado opuesto existiera una colonia de *V. dahliae* D V-138I o no (Figs. 12A y B). Además, cuando a cada lado del medio se estableció una colonia de uno de los dos hongos al mismo tiempo, T11 tardó más tiempo en cruzar la franja de la placa sin medio (Fig. 12C), pero siempre acabó inhibiendo el crecimiento de la colonia de V-138I (Fig. 12D).

Además, cuando en la placa se inoculó V-138I 4 días antes que T11, se observó que la inhibición del crecimiento fue recíproca. Los primeros días, V-138I solo permitía el crecimiento de T11 a lo largo de la franja sin medio de la placa, y en mayor medida por las zonas más alejadas de la colonia del patógeno (Fig. 13). Sin embargo, esa inhibición del crecimiento de T11 por V-138I fue solo temporal, porque T11 finalmente superó la franja de discontinuidad y sobrecreció la colonia de *V. dahliae* D V-138I. Por otro lado, en comparación con el tamaño de las colonias observado en las placas control (V-138I frente a V-138I), la cepa T11 inhibía, en la distancia, el crecimiento de V-138I aproximadamente un 23% a los 2 días de su enfrentamiento y este valor aumentaba hasta un 58,5% tras 7 días. Estos resultados indicarían que ambos hongos son capaces de “sentirse” y “reconocerse” en la distancia.



**Figura 12.** Crecimiento de *T. atroviride* T11 en un cultivo de agar discontinuo. A) T11 tras 12 días de incubación en PDA; B) T11 tras 14 días de incubación; C) T11 (derecha) enfrentando a V-138I (izquierda) (inoculados al mismo tiempo) tras 14 días de incubación; y D) T11 (derecha) enfrentando a V-138I (izquierda) (inoculados al mismo tiempo) tras 24 días de incubación.



**Figura 13.** Crecimiento de *T. atroviride* T11 en un cultivo de agar discontinuo tras 11 días de incubación. A) T11 (arriba) enfrentado con agua (abajo); B) T11 (arriba) enfrentado con T11 (abajo); C) T11 (arriba) enfrentado con V-138I (abajo), e inoculados ambos al mismo tiempo; D) T11 (arriba) enfrentado con V-138I (abajo), éste inoculado 4 días antes.

#### 1.4. Colonización de la rizosfera de plantas de olivo “Picual”

Con objeto de evaluar la capacidad de *Trichoderma* para colonizar la rizosfera de olivo, se realizaron ensayos *in vivo* con plantas de 4 meses de la variedad Picual y las cepas *T. asperellum* Bt3, *T. atroviride* T11 y *T. asperellum* T25, aplicadas al suelo y en el agua de riego, tal cual se describen en el Apartado 11.2 de Materiales y Métodos.

Las densidades medias de inóculo que se establecieron en la rizosfera de los plantones tratados y testigos (control) a las 2 semanas de incubación o 3 meses después de ella se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Colonización de la rizosfera e infección endofítica de plantones de olivo de 4 meses de la variedad “Picual” por las cepas T11 de *T. atroviride*, y Bt3 y T25 de *T. asperellum*, tras 2 y/o 12 semanas de aplicar el tratamiento mediante infestación del suelo o mediante riego con suspensión de conidias.

Tratamiento*	Población rizosférica (ufc/g raíz)**	Población endofítica (% en trozos de raíz)***	Población rizosférica (ufc/g raíz)**
	2 semanas	2 semanas	12 semanas
Control (suelo)	0,0	0,0	0,0
Bt3-suelo	1,6 x 10 <sup>6</sup>	6,3	1,9 x 10 <sup>5</sup>
T11-suelo	2,6 x 10 <sup>6</sup>	14,6	2,6 x 10 <sup>5</sup>
T25-suelo	4,4 x 10 <sup>6</sup>	25	4,5 x 10 <sup>5</sup>
Control (riego)	0,0	0,0	0,0
Bt3-riego	2,0 x 10 <sup>5</sup>	0,0	1,8 x 10 <sup>5</sup>
T11-riego	5,8 x 10 <sup>5</sup>	14,6	2,4 x 10 <sup>5</sup>
T25-riego	7,0 x 10 <sup>5</sup>	8,3	1,9 x 10 <sup>5</sup>

\*Los plantones se trasplantaron a macetas con suelo combinado con una mezcla de WCMS infestado con *Trichoderma* hasta alcanzar una densidad de inóculo de 1,0 x 10<sup>7</sup> ufc por g de suelo o las macetas se regaron con 60 mL de una suspensión de 1,0 x 10<sup>7</sup> conidias mL<sup>-1</sup> después de trasplantar. Los datos son media de ocho plantas por tratamiento.

\*\*Los datos se expresan como media de ufc por g de suelo y los recuentos se determinaron en diluciones seriadas procedentes del líquido de lavado sonicado obtenido a partir de 1 g de segmentos de raíz de 1 cm de longitud.

\*\*\*Los datos se expresan como porcentaje y se refieren a un número total de 96 fragmentos testados por tratamiento (12 fragmentos de raíz por planta, y ocho plantas).

Las cepas T11 de *T. atroviride*, y Bt3 y T25 de *T. asperellum* fueron capaces de colonizar, en mayor o menor medida, la rizosfera de plantas de olivo “Picual”, pero la extensión de la colonización se vio influenciada por el método de inoculación empleado. Dos semanas después de trasplantar a macetas con suelo combinado con una mezcla infestada por *Trichoderma* spp., la cepa T25 se observó en el 25% de los fragmentos de raíz muestreados y alcanzó una población rizosférica de 4,4 x 10<sup>6</sup> ufc por g de tejido fresco de raíz. Comparativamente, la cepa Bt3 se observó en el 6,3% de los fragmentos de raíz y había alcanzado una población rizosférica 2,75 veces menor que la de T25. Ambas medidas mostraron valores intermedios para la cepa T11, i.e., menores

que para T25 pero mayores que para Bt3. Cuando la inoculación con el hongo se realizó mediante riego con una suspensión de conidias, solamente T11 y T25 había infectado endofíticamente la raíz, alcanzando valores de 14,6 y 8,3% respectivamente, mientras que las tres cepas alcanzaron una población rizosférica de aproximadamente un orden de magnitud inferior que la obtenida cuando se aplicaron infestando el suelo. Sin embargo, 3 meses después de incubar se había producido una reducción de la densidad de población rizosférica para las tres cepas, siendo esta reducción de casi un orden de magnitud cuando la cepa se había aplicado infestando el suelo y menor cuando el tratamiento se había realizado mediante riego con una suspensión de conidias de la misma.

### 1.5. Supresión de la Verticilosis en plantas de olivo “Picual”

El efecto del tratamiento con *Trichoderma* spp. en el desarrollo de la VO causada por la cepa de *V.dahliae* D V-138I en plantas de olivo “Picual” se evaluó en ensayos *in vivo*, descritos en el Apartado 11.1 de Materiales y Métodos. El desarrollo de la enfermedad en los plantones tratados con las cepas T11 de *T. atroviride*, y Bt3 y T25 de *T. asperellum*, así como en los testigos inoculados solo con *V. dahliae* V-138I, se presentan en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Efecto del tratamiento con las cepas Bt3 y T25 de *T. asperellum* y T11 de *T. atroviride* sobre el desarrollo de la Verticilosis en olivo “Picual” crecidos en suelo infestado con la cepa D *V. dahliae* V-138I<sup>a</sup>.

Tratamiento	Periodo de incubación (días) <sup>b</sup>	Incidencia de enfermedad (%)	Severidad de síntomas (0-4)	Área estandarizada bajo la curva de progreso de enfermedad
Control	29,5	92,5	3,3	2,1
Bt3	36,9*	87,5	2,3*	1,1*
T11	32,3	95,0	2,8	1,6*
T25	37,1*	95,0	2,4*	1,2*
<b>Contraste (P)<sup>c</sup></b>				
Bt3 vs T25	0,8681	0,1734	0,7858	0,5739
T11 vs T25	0,0021*	1,0	0,1804	0,0756
<i>T. asperellum</i> vs <i>T. atroviride</i>	0,0007*	0,4311	0,0890	0,0180*

<sup>a</sup>Los plantones se trasplantaron a macetas con suelo combinado con una mezcla de WCMS infestado con *Trichoderma* spp. hasta alcanzar una densidad de inóculo de  $1,0 \times 10^7$  ufc por g de suelo o las macetas se regaron con 60 mL de una suspensión de  $1,0 \times 10^7$  conidias mL<sup>-1</sup> después de trasplantar. Tras dos semanas de incubación, se trasplantaron a macetas con suelo infestado con  $1,3 \times 10^6$  conidias por g de suelo de *V. dahliae* V-138I. Ya que el método de aplicación de *Trichoderma* spp, suelo o riego, no influyó en la reacción de enfermedad, los datos de ambas formas de aplicación se procesaron de forma conjunta dentro de cada tratamiento. Los datos son media de 40 plantas por tratamiento.

<sup>b</sup>Tiempo de aparición de los primeros síntomas.

<sup>c</sup>En cada columna, valores seguidos por un \* indica diferencias significativas entre un tratamiento y el control o entre las dos especies de *Trichoderma* spp. consideradas, según el contraste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

En todos los casos, los plantones de “Picual” tratados o no con *Trichoderma* spp. que no habían sido inoculados con *V. dahliae*, incluidos como control, crecieron sin síntomas y de forma satisfactoria. Por el contrario, los plantones inoculados con *V. dahliae* V-138I mostraron los síntomas de defoliación característicos del patotipo D del hongo, independientemente del tratamiento que habían recibido con *Trichoderma* spp.

Ninguna de las cepas de *Trichoderma* spp. redujo la incidencia de la Verticilosis, que varió entre 87,5 y 95% según el tratamiento. Sin embargo, comparado con el control no tratado, las cepas de *T. asperellum* retrasaron el comienzo de la enfermedad en algo más de 1 semana ( $P \leq 0,05$ ) y como consecuencia de ello redujeron significativamente el progreso temporal de los síntomas en 43-48% ( $P \leq 0,05$ ) y la severidad final de éstos en aproximadamente un 30% ( $P \leq 0,05$ ). Globalmente, *T. asperellum* fue más eficiente que *T. atroviride* en el control de la enfermedad.

El tratamiento del sistema radical de la planta con inóculo de las cepas de *Trichoderma* spp. incrementó el crecimiento de los plantones de olivo, pero este efecto fue mayor cuando el inóculo fúngico se estableció en el sustrato que cuando se aportó en suspensión acuosa y su magnitud varió según la cepa (Tabla 13). En las plantas no infectadas por *V. dahliae*, solo la cepa *T. asperellum* T25 tuvo un efecto significativo ( $P \leq 0,05$ ) sobre el crecimiento de la planta, cuyo tallo alcanzó una longitud 126,1 y 25,1% superior a la del control no tratado en el caso de sustrato infestado e inóculo en suspensión acuosa, respectivamente.

**Tabla 13.** Efectos del tratamiento del sistema radical de la planta con las cepas Bt3 y T25 de *T. asperellum* y T11 de *T. atroviride* y la inoculación con *V. dahliae* D V-138I (Vd)<sup>a</sup> en el crecimiento de plantones de olivo “Picual”.

Tratamiento	<u>Método de aplicación de <i>Trichoderma</i> spp.</u>			
	Sustrato infestado		Suspensión de conidias	
	-Vd	+Vd	-Vd	+ Vd
<b>Control (no tratado)</b>	17,6	8,6	19,1	5,9
<b>Bt3</b>	28,0	11,4	23	8,2
<b>T11</b>	27,7	13,9*	17,5	17,1*
<b>T25</b>	39,8*	15,7*	23,9*	14,2*
<b>Contraste (<math>P</math>)<sup>b</sup></b>				
<b>Bt3 vs T25</b>	0,0245*	0,0149*	0,8737	0,0008*
<b>T11 vs T25</b>	0,0213*	0,3060	0,2223	0,0871
<b><i>T. asperellum</i> vs <i>T. atroviride</i></b>	0,1711	0,8154	0,1877	0,0001*

<sup>a</sup>Los plantones se trasplantaron a macetas con suelo combinado con una mezcla de WCMS infestado con *Trichoderma* spp. hasta alcanzar una densidad de inóculo de  $1,0 \times 10^7$  ufc por g de suelo o las macetas se regaron con 60 mL de una suspensión de  $1,0 \times 10^7$  conidias mL<sup>-1</sup> después de trasplantar. Tras dos semanas de incubación, se trasplantaron a macetas con suelo infestado con  $1,3 \times 10^6$  conidias por g de suelo de *V. dahliae* V-138I. Los datos son media de la altura en cm de 20 plantas por tratamiento.

<sup>b</sup>En cada columna, valores seguidos por un \* indica diferencias significativas entre un tratamiento y el control o entre las dos especies de *Trichoderma* spp. consideradas, según el contraste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

La infección por *V. dahliae* V-138I D redujo la longitud del tallo de las plantas no tratadas en un 51-69% respecto del testigo no inoculado. El tratamiento con *Trichoderma* spp. contrarrestó en parte dicha reducción, dando lugar a un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) de dicha longitud de 62 y 82% respecto del testigo no tratado para *T. atroviride* T11 y *T. asperellum* T25, respectivamente, cuando las plantas se inocularon en sustrato infestado, y de 190 y 141% respectivamente cuando se trataron con suspensión de conidias. No obstante, aún con dicho incremento, las plantas infectadas por *V. dahliae* V-138I D alcanzaron como máximo la mitad de la altura de las plantas no infectadas y tratadas.

## **2. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL ANTAGONISMO DE *Trichoderma atroviride* T11 CONTRA *Verticillium dahliae* V-138I**

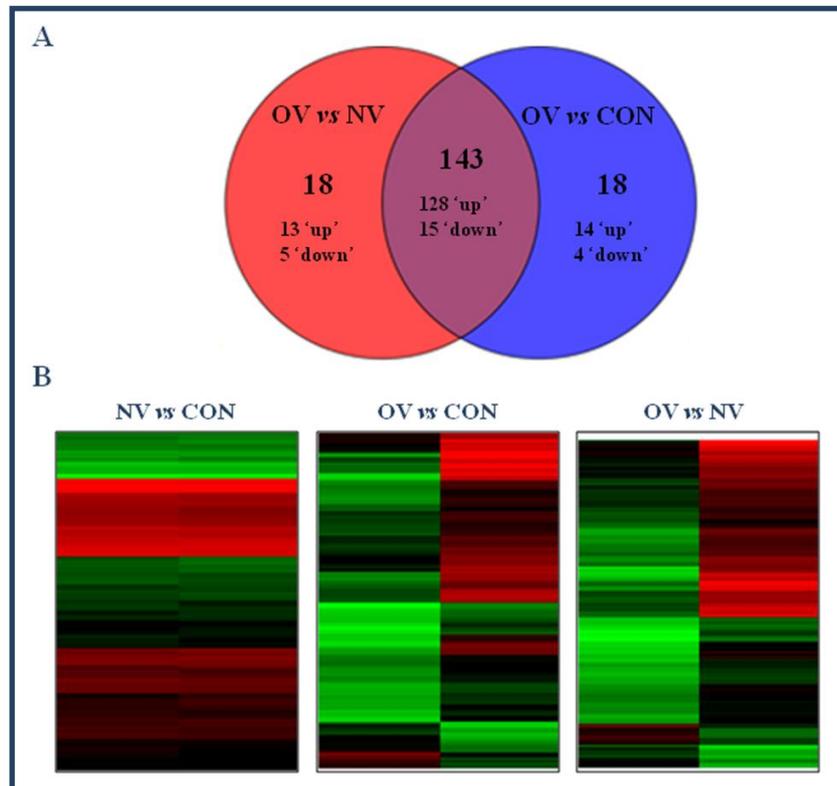
Para investigar los mecanismos moleculares que subyacen en la inhibición de *V. dahliae* V-138I D por *T. atroviride* T11 observada en diferentes ensayos *in vitro*, se analizaron los cambios transcriptómicos ocurrido en T11 tras crecer ambos hongos bajo diferentes condiciones de cultivo. Se utilizó como herramienta un ‘microarray’ de *Trichoderma* spp. de alta densidad de oligonucleótidos (HDO), pues contiene 385.000 sondas, y se siguieron los protocolos descritos en el Apartado 8 de Materiales y Métodos.

### **2.1. Análisis de los cambios transcriptómicos de *Trichoderma atroviride* T11 ocasionados por *Verticillium dahliae* D V-138I**

Con el objeto de identificar los genes asociados al antagonismo de la cepa T11 sobre la cepa V-138I D, se determinaron de forma global los niveles de transcritos de T11 crecido bajo tres condiciones de cultivo diferentes y, con los tres grupos de datos de expresión, se realizaron las siguientes comparaciones: i) T11 crecido sobre V-138I (OV) respecto a T11 crecido sola (CON) y ii) OV respecto a T11 crecido a 0,5 cm de V-138I (NV).

Los resultados del análisis identificaron 161 genes que significativamente ( $P \leq 0,05$  y FDR: 0,15) cambiaron su expresión más de dos veces ( $FC > 2$ ) entre las condiciones OV y CON. Este número equivale a un 0,47% de los genes representados por las 385.000 sondas que contiene el ‘microarray’ HDO de *Trichoderma* spp. La mayoría de ellos, 143 genes, también mostraron cambios significativos de expresión tras comparar las condiciones OV y NV. En la Fig. 14 se muestran la distribución de los 179 genes expresados diferencialmente mediante un diagrama de Venn (Fig. 14A) y el mapa caliente que representa los perfiles de expresión de T11 obtenidos mediante el análisis de ‘microarray’ (Fig. 14B).

La mayoría de los genes expresados diferencialmente en la cepa T11 (98,6%) se habían identificado a partir de hibridaciones de sondas diseñadas sobre el genoma de *T. atroviride*. Por tanto, al menos, esos 143 genes de la cepa T11 pueden ser asociados con su antagonismo contra *V. dahliae* D V-138I. Un resumen de las principales categorías funcionales en las que quedaron localizados estos 143 genes se presenta en la Tabla 14. De los 143 genes, 128 fueron sobrerregulados (89,51%) y 15 infrarregulados (10,49%).



**Figura 14.** Genes de *T. atroviride* T11 expresados diferencialmente en el análisis de 'microarrays'. A, Diagrama de Venn que muestra el número de genes que presentaron cambios significativos ( $P \leq 0,05$ ) de expresión de más de dos veces ( $FC > 2$ ) ('Up', sobrerregulados; 'down', infrarregulados) en T11 en respuesta al sobrecrecimiento de la colonia de *V. dahliae* V-138I D (OV) y a la presencia de una colonia de V-138I a 0,5 cm de distancia (NV) en comparación con el control, T11 creciendo sola (CON). B, Mapa caliente que muestra el agrupamiento jerarquizado de los perfiles que mostraron cambios significativos de expresión en T11 tras su crecimiento en las tres condiciones indicadas antes (rojo, genes sobrerregulados; verde, genes infrarregulados). Se utilizaron para el análisis los datos de 3 réplicas técnicas procedentes de una mezcla de, al menos, 5 réplicas biológicas para cada condición.

Se asignaron términos GO a 104 de esos 143 genes y un posterior análisis de enriquecimiento reveló que 30 categorías GO estaban significativamente sobrerrepresentadas ( $P < 0,05$ ) en *T. atroviride* T11 cuando esta cepa sobrecrecía *V. dahliae* V-138I. Una distribución de estos 104 genes en las tres principales categorías ontológicas descritas: Procesos Biológicos (PB), Función Molecular (FM) y Componente Celular (CC), mostró un solapamiento entre términos dentro de las numerosísimas subcategorías donde quedaban localizados muchos de los genes. Sin

embargo, una asociación manual de aquellas subcategorías GO similares mostró que “metabolismo” (57 genes,  $P: 6,4 \times 10^{-5}$ ) y “proteólisis” (11 genes,  $P: 3,2 \times 10^{-5}$ ) eran los dos procesos sobrerrepresentados dentro de la categoría PB, que “catalítica” (71 genes,  $P: 2,1 \times 10^{-12}$ ), particularmente oxidoreductasas, hidrolasas y ligasas, y “transporte” (12 genes  $P: 0,0014$ ) eran las actividades sobrerrepresentadas dentro de la categoría FM, y la subcategoría “integral de membrana” (11 genes,  $P: 3,5 \times 10^{-8}$ ) estaba sobrerrepresentada dentro de la categoría CC.

**Tabla 14.** Resumen de la distribución funcional de los 143 genes expresados diferencialmente durante el micoparasitismo de *T. atroviride* T11 sobre *V. dahliae* D V-138I.

Juegos de sondas	Nº
<b><u>Sobrerregulados ('Up')</u></b>	
Metabolismo	
Carbohidratos	21
Lípidos y ácidos grasos	7
Proteínas	10
Amino ácidos	4
Ácidos nucleicos	2
Secundario	20
Energía	5
Procesos y señalización celular	
Transporte	14
Defensa	6
Señalización	4
Contacto y comunicación célula-célula	1
Detoxificación	1
Pared celular y membrana	2
Regulación	3
Eventos postraduccionales	3
Conservación y procesamiento de la información	
Transcripción	1
Traducción	2
Función desconocida	22
<b><u>Infrarregulados ('Down')</u></b>	
Metabolismo	
Carbohidratos	2
Lípidos y ácidos grasos	1
Secundario	2
Energía	1
Procesos y señalización celular	
Señalización	2
Contacto y comunicación célula-célula	1
Función desconocida	6

Para evitar algunos de los problemas derivados de la anotación automática como el solapamiento de términos GO, la no asignación funcional para varios genes o los errores de anotación en bases de datos, se realizó un análisis BLASTP lanzando cada uno de los 143 genes expresados diferencialmente cuando *T. atroviride* T11 sobrecrece la colonia de *V. dahliae* D V-138I. Por esta vía, se pudo asignar función putativa a 11 de 39 los genes que aparecían con “función desconocida” tras la anotación automática. En la Tabla 15 se presenta la distribución funcional de dichos genes en subgrupos asociados a tres eventos fisiológicos como son el metabolismo, los procesos celulares y señalización, y el almacenamiento de información y procesamiento.

Los datos revelaron una marcada sobreexpresión de genes que codifican proteínas implicadas en procesos de metabolismo primario de carbohidratos (21 genes), proteínas (10 genes), lípidos y ácidos grasos (siete genes), y aminoácidos (cuatro genes). Las principales actividades hidrolíticas relacionadas con el micoparasitismo correspondieron a glucanasas y peptidasas. Además, se observó sobreexpresión de genes que codifican enzimas incluidas dentro de todas las categorías descritas en la base de datos ‘Carbohydrate-Active enZymes’ (CAZyme, 1998). Se encontraron cinco endo- $\beta$ -1,3-glucanasas, dos exo- $\beta$ -1,3-glucanasas, una quitinasa y una  $\alpha$ -amilasa (Glicósido hidrolasas, GHs); dos esterasas y una cutinasa (Carbohidrato esterasas, CEs); tres glicosil transferasas (GTs); una liasa de polisacáridos (PL); una celulasa con dominio de unión a quitina (proteínas con módulos de unión a carbohidratos, CBMs); y cuatro oxidoreductasas (actividad auxiliar, AA). Y, también estuvieron sobreexpresados genes que codifican proteínas envueltas en procesos del metabolismo secundario, siendo las más abundantes oxidoreductasas (siete genes) y monooxigenasas (siete genes).

Los procesos más representados dentro del evento fisiológico “procesos celulares y señalización” fueron el transporte (14 genes), la defensa (seis genes) y la señalización (tres genes).

De los 18 genes infraregulados pertenecientes al grupo de los 143 expresados diferencialmente en la condición OV, tanto en OV vs NV como en OV vs CON, 12 se localizaban en diferentes subgrupos funcionales y los otros seis codificaban proteínas con función desconocida, por tanto, no se pudieron asociar a un único evento fisiológico.

**Tabla 15.** Distribución funcional de los 143 genes expresados diferencialmente (FC > 2, FDR: 0,15) durante el micoparasitismo de *T. atroviride* T11 sobre *V. dahliae* D V-138L.

Distribución funcional	Función putative	Nº de genes	JGI ID <sup>a</sup> 'Up'/'Down'
<b><u>Metabolismo</u></b>			
Carbohidratos	Glicosil hidrolasa	11	32968, 33348, 37969, 41194, 46148, 48371, 52592, 54743, 217415, 224184, 161159*
	Esterasa	3	42346, 79361, 302304
	Liasa	1	82388
	Glucosiltransferasa	4	77441, 184052, 288740, 224400*
Lípidos y ácidos grasos	Oxidoreductasa	4	37996, 90220, 217448, 275833
	Esterasa	3	43454, 282317, 322224
	Ligasa de ácidos grasos	2	90126, 229608
	Liasa	1	43297
Proteínas	Glicerol quinasa	1	39628
	Metiltransferasa tipo 11	1	140671*
	Peptidasa	10	36337, 54382, 168477, 179435, 227276, 288311, 292296, 299629, 301733, 302419
Amino ácidos	Aminotransferasa	1	30776
	Cisteína sintasa	1	93352
	Fenilalanina racemasa	1	52932
Ácidos nucleicos	Acetiltransferasa	1	260926
	Desoxiribonucleasa	1	35700
Secundario	Dihidrofolato reductasa	1	314350
	Oxidoreductasa	9	42070, 43092, 43714, 48755, 84122, 210776, 314346, 45759*, 280794*
	Policétido sintasa (PKS)	2	32458, 211357
	Péptido sintetasa no ribosómico (NRPS)	1	156569
	Monooxigenasa dependiente de flavina	3	32449, 52551, 250440
	Prenil transferasa	2	42245, 295847
	Citocromo P450 monooxigenasa	4	37750, 43598, 84128, 295844
Energía	Beta-lactamasa	1	90918
	Oxidoreductasa	4	46393, 53082, 162830, 239450
	Fosfatasa	1	221344
	Fosfotransferasa	1	288362*
<b><u>Procesos y señalización celular</u></b>			
Transporte	Oligopéptidos (OPT)	2	129432, 232557
	MFS	6	53012, 81541, 84436, 262763, 251581, 280284
	Nucleótidos	1	229348
	Oxígeno	1	139683
	Compuestos inorgánicos	1	284539
	Aminoácidos	2	81501, 296589
	Acetato	1	290277
Defensa	Proteína de choque térmico	2	299986, 301737
	Proteína tipo Mss4	1	85009
	Glutation S-transferasa	1	77850
	Glicolato oxidasa	1	142741
	N-acetiltransferasa (familia GNAT)	1	37150
Señalización	Pequeñas proteínas	4	290919, 298730, TriviG29_70385**,

	secretadas ricas en cisteínas (SSCPs)		283740*
	Receptor acoplado a proteína G	1	300292*
	Fosfolipasa	1	239712
Contacto y comunicación célula-célula	Proteína de reordenamiento de puntos de hipermutabilidad	1	294485*
	Receptor tipo Tol	1	269934
Detoxificación	Proteína de tráfico de arginina	1	278807
Pared celular y membrana	Proteína integral de membrana	1	46317
	Expansina	1	81348
Regulación	Factor de transcripción	3	41299, 164928, 301901
Eventos postraduccionales	Isoflavona reductasa tipo NmrA (regulador)	3	256937, 302964, 88236
<b><u>Conservación y procesamiento de la información</u></b>			
Transcripción	Metiltransferasa	1	90244
Traducción	Aminoacil ARNt ligasa	1	131910
	Amidotransferasa	1	246441
<b><u>Función desconocida</u></b>		28	41076, 45640, 80087, 84109, 84120, 91815, 133896, 149070, 161123, 161189, 216890, 282555, 283182, 287810, 287819, 302305, 302477, 314204, 314352, 316023, 318147, TriviGv29_219707**, 45728*, 157437*, 281902*, 286410*, 300808*, 313961*

<sup>a</sup>Identificación (ID) a partir de sondas diseñadas sobre el genoma de *T. atroviride* ['Joint Genome Institute' (JGI)], excepto aquellos genes señalados con \*\* que fueron identificados a partir de sondas de *T. virens* y todos ellos fueron sobrerregulados ('Up'). Los genes infrarregulados identificados a partir de sondas diseñadas sobre el genoma de *T. atroviride* se indican con \*.

Como se puede observar en la Fig. 14, un grupo de 18 genes mostró expresión diferencial solo entre OV y CON, de los cuales 14 estuvieron sobrerregulados y cuatro infrarregulados. En la Tabla 16 se presenta la asignación funcional para estos 18 genes y su distribución en los tres eventos fisiológicos citados anteriormente. Destaca, entre los 15 genes a los que se pudo asignar una función putativa, la sobrerregulación de dos hidrolasas y tres transportadores, y los cambios en el metabolismo secundario.

Por último, también se separó un grupo de 18 genes, 13 sobrerregulados y cinco infrarregulados, debido a que mostraban solo expresión diferencial entre OV y NV (Tabla 17). El transporte fue la actividad más representada con tres genes, aunque parecía disminuir ya que dos de ellos fueron infrarregulados.

**Tabla 16.** Asignación funcional de los 18 genes expresados diferencialmente (FC > 2, FDR: 0,15) solo entre las condiciones de *T. atroviride* T11 sobrecreciendo *V. dahliae* D V-138I (OV) y T11 creciendo sola (CON).

Distribución funcional	Función putativa (Límite de 'E-value' < 10 <sup>-20</sup> )	Lg <sub>2</sub> 'Up'/'Down' <sup>b</sup>	JGI ID <sup>a</sup>
<b><u>Metabolismo</u></b>			
Carbohidratos	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta	4,69	306768
	β-1,3-glucanasa	2,44	315637
	α-1,3-glucanasa	2,02	81097
Secundario	Monooxigenasa (taurina)	-2,43	46162
	Proceso metabólico de tirosina	-2,35	63940
	Biosíntesis de pneumocandina	2,12	51260
	Citocromo P450 monooxygenasa	2,08	263459
<b><u>Procesos y señalización celular</u></b>			
Transporte	MFS	2,38	30874
	Purina permeasa	2,25	42539
	Alantoato permeasa	2,23	46082
Defensa	Proteína de choque térmico 78	2,17	157172
Señalización	Receptor acoplado a proteína G	2,08	130836
Detoxificación	Proteína de ensamblaje de citocromo oxidasa	4,44	84409
Regulación	Regulador transcripcional de hongos	2,07	321925
Adhesión	Fibronectina	-2,64	299265
<b><u>Función desconocida</u></b>			
	-	2,10	171019
	-	2,01	302901
	-	-2,01	300321

<sup>a</sup>Identificación (ID) a partir de sondas diseñadas sobre el genoma de *T. atroviride* ['Joint Genome Institute' (JGI)], excepto 63940 que fue identificado a partir de sondas de *T. virens*.

<sup>b</sup>Los valores precedidos por un signo negativo indica que fueron infrarregulados.

**Table 17.** Asignación funcional de los 18 genes expresados diferencialmente (FC > 2, FDR: 0,15) entre las condiciones *T. atroviride* T11 sobrecreciendo *V. dahliae* D V-138I (OV) y T11 creciendo a 0,5 cm de V-138I (NV).

Distribución funcional	Función putativa (Límite de 'E-value' < 10 <sup>-20</sup> )	Lg <sub>2</sub> 'Up'/'Down', <sup>b</sup>	JGI ID <sup>a</sup>
<b><u>Metabolismo</u></b>			
Carbohidratos	α-acetolactato descarboxilasa	2,16	48180
	Serina proteinasa ( <i>aorsin</i> )	2,10	145909
Lípidos	Fosfatidilserina descarboxilasa	2,11	146755
	3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa	2,01	214542
Nitrógeno	NAD(P)H azoreductasa	2,43	297537
Secundario	Chanoclavina sintetasa	-2,04	152289
<b><u>Procesos y señalización celular</u></b>			
Transporte	MFS	-2,97	41962
	MFS	-2,85	42539
	Monocarboxilato	2,29	296804
	Superóxido Fe/Mn	2,12	48025
Señalización	Proteína con ankyrinas reperidas	2,34	181516
Adhesión	Proteína con módulos de tipo factor von Willebrand	2,11	213544
<b><u>Función desconocida</u></b>			
	-	-2,87	77767
	-	-2,29	297301
	-	2,17	49033
	-	2,10	35776
	-	2,03	185735
	-	2,02	49033

<sup>a</sup>Identificación (ID) a partir de sondas diseñadas sobre el genoma de *T. atroviride* ['Joint Genome Institute' (JGI)].

<sup>b</sup>Los valores precedidos por un signo negativo indica que fueron infrarregulados.

## 2.2. Actividad proteasa

Considerando que la proteólisis es uno de los procesos biológicos sobrerrepresentados en el micoparasitismo de *T. atroviride* T11 sobre *V. dahliae* D V-138I, se determinó la actividad proteasa en las proteínas intracelulares obtenidas de micelio procedente de colonias de la cepa T11 que se desarrollaron bajo las tres condiciones de cultivo consideradas en el análisis de ‘microarrays’ (OV, NV y CON).

Los valores de actividad proteasa se presentan en la Tabla 18. La actividad en la condición OV fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que aquellas obtenidas en las condiciones NV y CON, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de estas dos últimas.

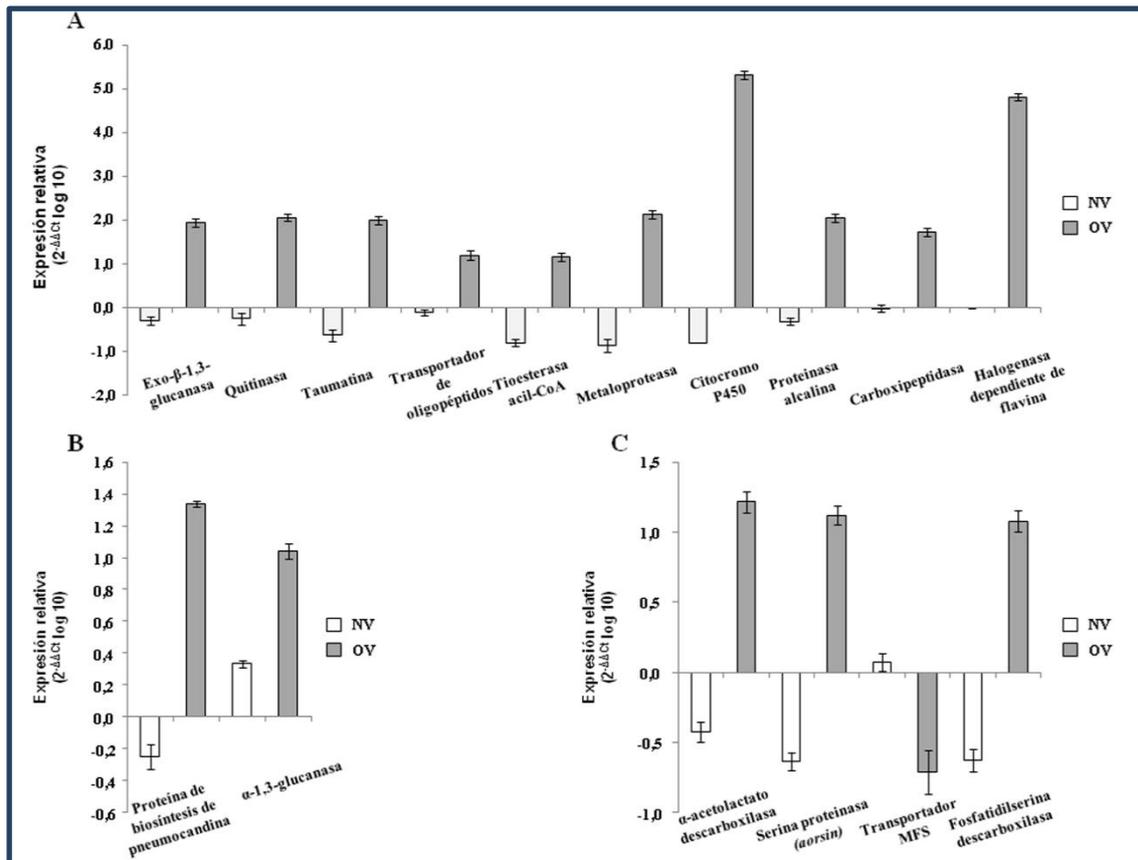
**Tabla 18.** Actividad proteasa detectada en proteínas intracelulares procedentes de micelios obtenidos de cultivos de *T. atroviride* T11 sobrecreciendo una colonia de *V. dahliae* D V-138I (OV), T11 a 0,5 cm de una colonia de V-138I (NV) y la cepa T11 crecida sola (CON).

Condición	Actividad proteasa específica*
CO	28,92 ± 1,17 a
NV	32,05 ± 1,54 a
OV	36,75 ± 0,54 b

\*Los valores medios son presentados como mmoles por minuto por mg de proteína con su desviación estándar y aquellos seguidos de diferente letra indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## 2.3. Confirmación mediante qPCR de los resultados obtenidos en el análisis de ‘microarrays’

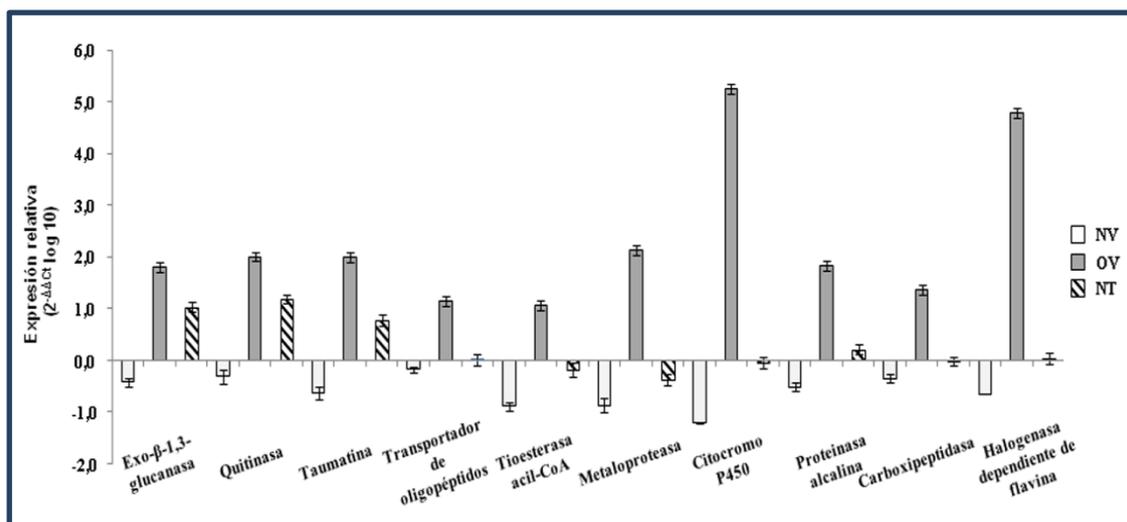
Con objeto de confirmar los resultados obtenidos en el análisis de ‘microarrays’ del subapartado 2.1 de esta sección, se realizó un análisis de expresión mediante qPCR de 16 genes que representaban a los 179 genes seleccionados por su expresión diferencial en el estudio transcriptómico. El perfil de expresión de estos 16 genes, elegidos arbitrariamente, se presenta en la Fig. 15. A su vez, 10 genes representaban a los 143 diferenciales entre las condiciones OV y NV o CON (Fig. 15A), dos a los 18 que fueron diferenciales solo entre las condiciones OV y CON (Fig. 15B), y dos genes a los 18 que fueron diferenciales solo entre OV y NV (Fig. 15C). Los perfiles de expresión obtenidos mediante el análisis por qPCR para todos los genes analizados fueron conforme con los datos obtenidos en el ‘microarray’, excepto para el gen que codifica una proteína implicada en la biosíntesis de pneumocandina, pues se observaron diferencias de expresión no solo entre las condiciones OV y CON sino también entre las OV y NV, y según esto último debería haberse agrupado en el conjunto formado por los 143 genes que se asociaban con el micoparasitismo de la cepa T11 sobre la cepa V-138I.



**Figura 15.** Expresión relativa obtenida en la qPCR para los 16 genes de *T. atroviride* T11 utilizados en la validación de los resultados del análisis ‘microarray’. La cepa T11 sobrecreciendo a *V. dahliae* D V-138I (OV), T11 crecida a 0,5 cm de V-138I (NV), y T11 crecida sola (CON), esta última utilizada como condición basal. A, genes que representan al conjunto de los expresados diferencialmente en la condición OV respecto a las condiciones NV y CON, con indicación de la proteína codificada por cada uno de ellos. B, genes que representan al conjunto de los expresados diferencialmente entre OV y CON, con indicación de la proteína que codifican. C, genes que representan al conjunto de los expresados diferencialmente entre OV y NV, con indicación de la proteína que codifican.

Con objeto de verificar que los cambios observados en los niveles de expresión de los genes de la cepa T11 de *T. atroviride* se deben a la cepa V-138I de *V. dahliae* D, se realizó un nuevo estudio de qPCR en el que, además de las condiciones OV, NV y CON, se consideró la condición de la cepa T11 enfrentada con ella misma (NT).

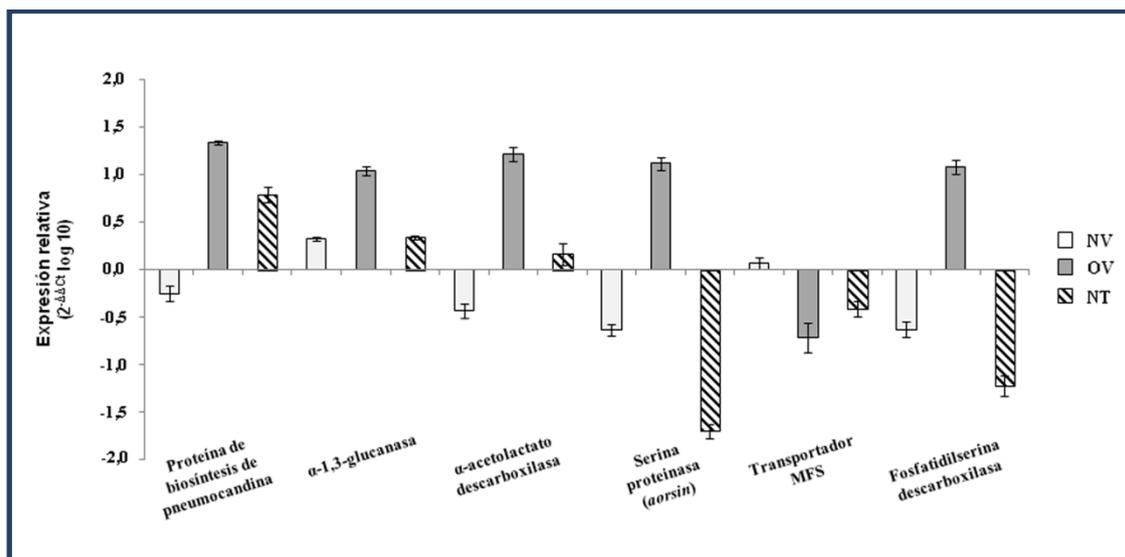
Los niveles de expresión relativa de los 10 genes que representan al conjunto de los 143 diferenciales entre la condición de OV y NV o CON se presentan en la Fig. 16. Se puede observar que los mayores niveles de transcrito correspondieron siempre a la condición OV, pero también existían diferencias entre las condiciones NV y NT, siendo siempre los valores superiores en la condición NT.



**Figura 16.** Niveles de expresión obtenidos mediante análisis qPCR para 10 genes de *T. atroviride* T11 representantes del grupo de 143 diferenciales entre OV y NV o CON, antes y después de contactar con *V. dahliae* D V-138I o consigo misma, con indicación de la proteína que codifican. La cepa T11 sobrecreciendo a V-138I (OV), T11 crecida a 0,5 cm de V-138I (NV), T11 crecida a 0,5 cm de T11 (NT) y T11 crecida sola (CON), esta última usada como condición basal.

Los niveles de expresión relativa de seis genes que representan a los dos grupos de 18 genes identificados en el análisis de ‘microarrays’, dos genes diferenciales solo entre las condiciones OV y CON y cuatro genes diferenciales solo entre OV y NV, obtenidos en el análisis qPCR que también incluyó la condición NT se presentan en la Fig. 17. Los perfiles de expresión observados en la condición OV, cinco genes sobreexpresados y uno infraexpresado, fueron conforme con los resultados obtenidos previamente (Fig. 15).

A tenor de los perfiles de expresión obtenidos para las condiciones OV, NV y NT (Fig. 17), se pueden establecer tres grupos entre los seis genes. Un grupo lo formarían los genes que codifican la peptidasa ID 145909 y la fosfatidilserina descarboxilasa ID 146755, respectivamente, pues mostraron un perfil asociado a micoparasitismo, sobreexpresados en la condición OV e infraexpresados en NV y NT. En otro grupo estaría el gen que codifica la  $\alpha$ -1,3-glucanasa ID 81097, pues se encontraba sobreexpresado en las tres condiciones, OV, NT y NV, aunque en mayor medida en la condición OV. Y el tercer grupo lo formarían los genes que codifican la  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa ID 48180, la proteína ID 51260 de la biosíntesis de pneumocandina y el transportador MFS ID 41962, que mostraron perfiles de expresión contrarios en las condiciones de NV y NT. Los dos primeros estaban sobreexpresados en NT pero infraexpresados en NV, y el gen que codifica el transportador estaba infraexpresado en NT pero sobreexpresado en NV.



**Figura 17.** Niveles de expresión obtenidos mediante análisis qPCR para seis genes de *T. atroviride* T11 representantes de los dos grupos de 18 genes que fueron diferenciales entre las condiciones OV y CON y entre OV y NV, antes y después de establecer contacto con *V. dahliae* D V-138I o consigo misma, con indicación de la proteína que codifican. La cepa T11 sobrecreciendo a V-138I (OV), T11 crecida a 0,5 cm de V-138I (NV), T11 crecida a 0,5 cm de T11 (NT) y T11 crecida sola (CON), esta última usada como condición basal.

### 3. MONITORIZACIÓN DE LA INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE OLIVO POR *Verticillium dahliae* Y PAPEL DE *Trichoderma* SPP. EN ESTOS PROCESOS

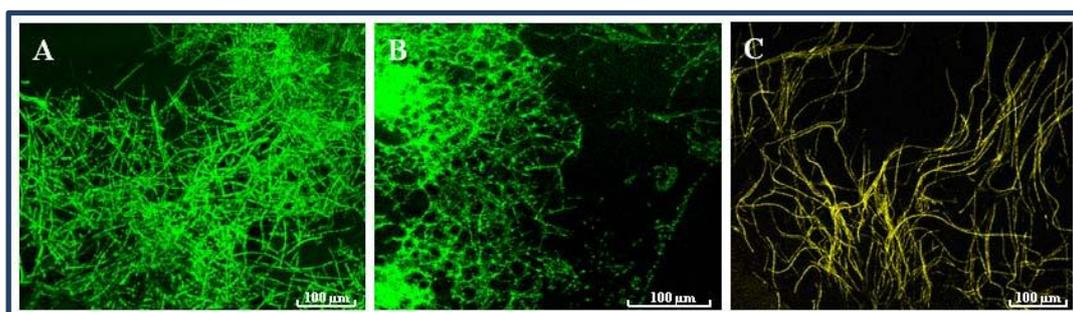
Con objeto de conocer el proceso de colonización por el patógeno de plantones de olivo y acebuche susceptibles o resistentes a *V. dahliae* D V-138I y, a su vez, el papel que pueden desempeñar distintas cepas de *Trichoderma* spp. en este proceso, se realizaron estudios utilizando microscopía confocal según se describe en el Apartado 12 de Materiales y Métodos, y material vegetal muestreado del ensayo de patogenicidad *in vivo* descrito en el Apartado 11.3 de Materiales y Métodos.

#### 3.1. Obtención y selección de transformantes de *Trichoderma* spp. que expresan una proteína fluorescente

Para diferenciar microscópicamente entre el micelio del patógeno y el del antagonista en la planta infectada, se obtuvieron transformantes de ambos hongos marcados con proteínas que producen distinta fluorescencia en ellos. Se obtuvieron transformantes de *V. dahliae* D V-138I que expresaban una proteína con fluorescencia amarilla mediante transformación vía *A. tumefaciens* con el plásmido pRF-HUE-YFP (Fig. 9) según se describe en el Apartado 9 de Materiales y Métodos. De un modo similar, pero utilizando diferentes plásmidos, entre ellos el pRF-HU-GFP y el

pCAMBIA-GFP, se obtuvieron transformantes de *T. atroviride* T11 y de *T. asperellum* T25 que expresaban una proteína con fluorescencia verde.

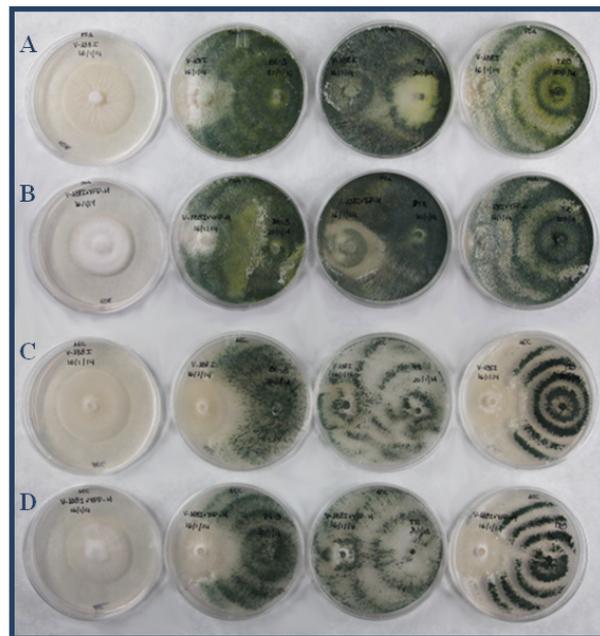
A partir de cultivos de las cepas T11, T25 y V-138I se obtuvieron al menos tres transformantes para cada una. En la Fig. 18 se presentan imágenes tomadas mediante microscopía confocal de micelio de uno de los transformantes obtenidos para cada una de estas tres cepas. Los transformantes se cultivaron alternativamente en medio selectivo y no selectivo, y tras varios subcultivos se observó que todos los transformantes de *T. atroviride* T11 presentaban diferencias morfológicas respecto de la cepa silvestre cada vez más acusadas. Además, mediante microscopía confocal se observó que estos transformantes perdían progresivamente fluorescencia al alternar tres veces, medio selectivo y no selectivo, para su crecimiento. Este hecho, junto con la vacuolización citoplasmática de sus hifas observada con microscopía confocal tras 2-3 días de crecimiento en medio no selectivo de todos los transformantes de T11 obtenidos, independientemente del plásmido utilizado (pRF-HU-GFP y pCAMBIA-GFP) para la transformación de dicha la cepa, invalidó su utilización en este tipo de estudios. Por el contrario, los transformantes de la cepa T25 no mostraron diferencias de morfología, crecimiento y grado de esporulación tras su incubación en los medios PDA, AEC y MM, tomando como referencia los parámetros de la cepa silvestre incubada bajo idénticas condiciones. Además, dichos transformantes demostraron poseer capacidad antagonista contra diferentes cepas de *V. dahliae*. Sin embargo, la fluorescencia emitida por el transformante T25-Gf, seleccionado por presentar la mayor fluorescencia entre todos los obtenidos a partir de la cepa T25, era menor que la observada en la cepa GFP22, un transformante de *T. harzianum* T34 no obtenido en ese trabajo y que se incluía como control.



**Figura 18.** Micelio de los transformantes A) *T. asperellum* T25-GFP-15a, B) *T. atroviride* T11-GFP-18a y C) *V. dahliae* V138-Yh, recogido de cultivos en PDA incubados a 25°C durante 3 (A y B) y 8 (C) días, observado mediante microscopía confocal. En la parte izquierda de la imagen B se puede apreciar la vacuolización citoplasmática de sus hifas.

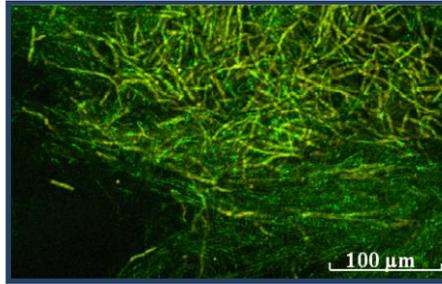
Los transformantes de *V. dahliae* D V-138I obtenidos en este trabajo mostraron estabilidad genética tras alternar su crecimiento en medios selectivo y no selectivo. Se seleccionó el transformante V138-Yh, que no mostró diferencias significativas de crecimiento en los medios PDA y AEC con la cepa silvestre V-138I, por poseer el

mayor grado de fluorescencia cuando su micelio se observaba bajo microscopía confocal. Tras 12 días de crecimiento en PDA, el diámetro medio de la colonia de V138I-Yh y V-138I fue respectivamente  $4,5 \pm 0,3$  y  $4,7 \pm 0,4$  cm, y el correspondiente de las colonias en medio AEC fue  $4,4 \pm 0,1$  y  $4,7 \pm 0,2$  cm, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 19, el transformante V138-Yh era sobrecrecido por las cepas de T11 de *T. atroviride*, y Bt3 y T25 de *T. asperellum*. En este sentido, no se observaron diferencias en el comportamiento antagonista de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre V-138I y sobre el transformante V138-Yh en ensayos de cultivo dual realizados con dos medios diferentes, PDA y AEC.



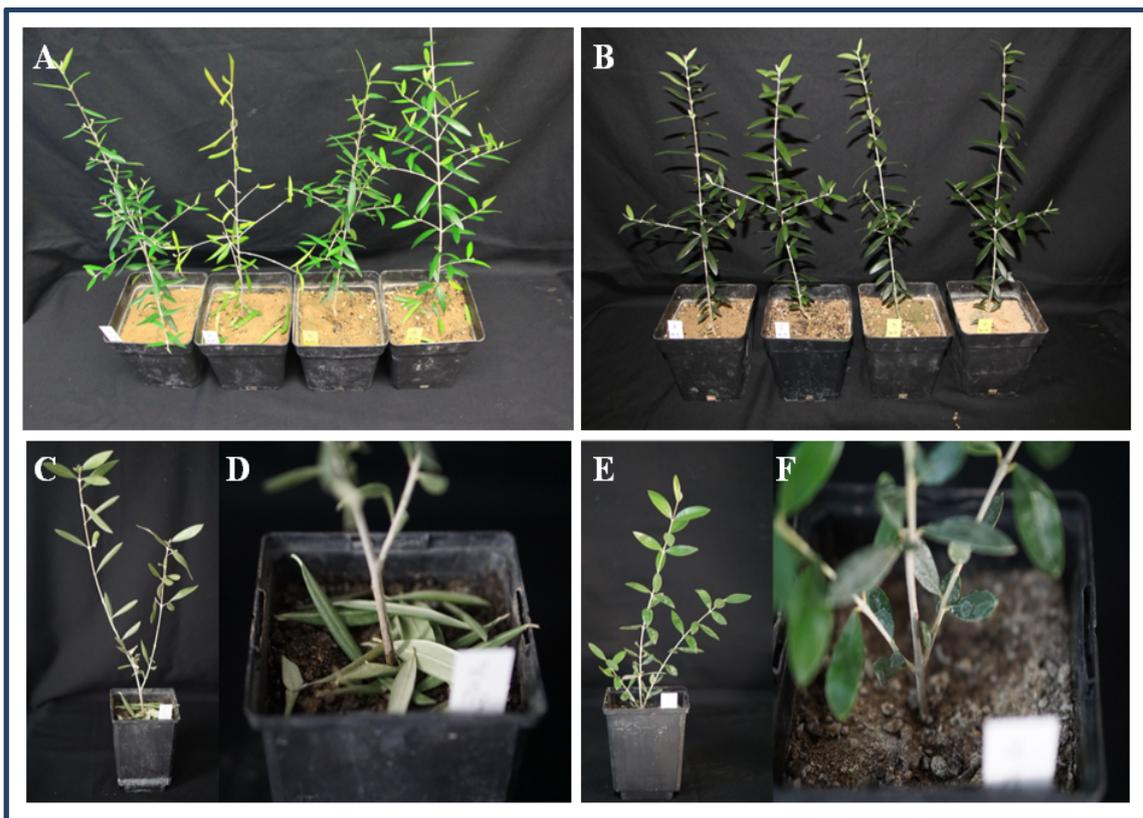
**Figura 19.** Cultivos duales de *Trichoderma* spp. y *V. dahliae* D V-138I (A y C) o el transformante *V. dahliae* D V138-Yh (B y D) tras 12 días a 25°C. La cepa de *Trichoderma* fue inoculada 4 días después que *V. dahliae* en medio PDA (A y B) o en medio AEC (C y D). A su vez, en cada fila de placas, la localización de las cepas es como sigue: solo *V. dahliae* (control), *T. asperellum* Bt3, *T. atroviride* T11 y *T. asperellum* T25.

En cultivo dual se observó que el transformante GFP22 expresó un nivel de antagonismo contra el transformante V138-Yh similar al observado para las cepas Bt3, T11 y T25. En la Fig. 20 se presenta una imagen de microscopía confocal de micelios recogidos de la zona de sobrecrecimiento de un cultivo dual y enfrentado de GFP22 y V138-Yh. Aún a falta de una cuantificación y teniendo la hifas de *V. dahliae* mayor diámetro que las de *T. harzianum*, en todas las preparaciones observadas de este tipo de co-cultivos se apreciaba una predominancia del color verde sobre el amarillo. Los transformantes *T. harzianum* GFP22 y *V. dahliae* D V138-Yh se seleccionaron para estudiar la colonización de olivo por el patógeno, en presencia o no de *Trichoderma* spp., mediante microscopía confocal.



**Figura 20.** Micelios de los transformantes *V. dahliae* D V138-Yh (amarillo) y *T. harzianum* GFP22 (verde), recogidos de la zona de sobrecrecimiento de un cultivo dual de 7 días de ambos hongos (GFP22 inoculada 4 días más tarde que V138-Yh), observado mediante microscopía confocal.

También, el transformante V138-Yh se mostró virulento sobre plántones de olivo “Picual” y el clon de acebuche susceptibles a *V. dahliae* D. A modo de ejemplo, en la Fig. 21 se presenta la sintomatología de Verticilosis característica del patotipo D observada en plántones de olivo “Picual” y del clon Ac-15 de acebuche 35 días después de la inoculación con V138-Yh. La inoculación similar de los clones Ac-4 y Ac-18 de acebuche con V138-Yh confirmó la reacción resistente de los mismos.

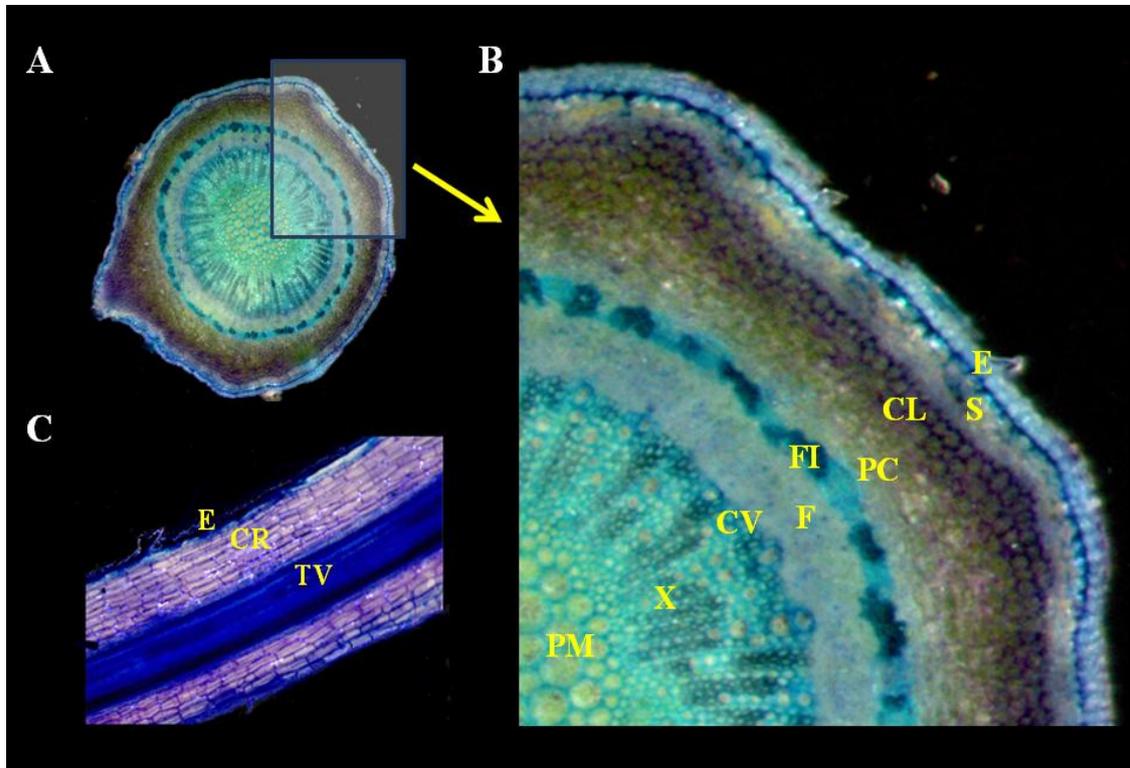


**Figura 21.** Sintomatología de la Verticilosis causada por el transformante V138I-Yh en plántones de olivo “Picual” y clones de acebuche con distinta susceptibilidad al patógeno. A) Plántones de acebuche “Ac-15” 35 días después de la inoculación con V138-Yh (macetas segunda y cuarta) comparado con los testigos no inoculados (macetas primera y tercera); B) *Ídem* para plántones de acebuche “Ac-4”; C) Plántón de “Picual” 35 días después de la inoculación con V138-Yh; D) Imagen ampliada de C, mostrando la defoliación característica del patotipo D de *V. dahliae*; E) Plántón asintomático de acebuche “Ac-18” 35 días después de la inoculación con V138-Yh; y F) Imagen ampliada de E.

### 3.2. Caracterización citológica de la colonización de la planta por el patógeno

El estudio de microscopía confocal láser se realizó sobre el material vegetal muestreado del ensayo *in vivo* descrito en el Apartado 13.1 de Materiales y Métodos. Este material vegetal correspondía a plántones de olivo “Picual” y los clones de acebuche Ac-4, Ac-15 y Ac-18, de 4 meses de edad, y procedentes de los siguientes tratamientos: T1: control, T2: *V. dahliae* D V138-Yh, T3: *T. harzianum* GFP22 y T4: *T. harzianum* GFP22 + *V. dahliae* D V138-Yh.

En la Fig. 22 se muestra la estructura secundaria del tallo y de la raíz de una planta de olivo “Picual” de 4 meses utilizando para ello un corte transversal y un corte longitudinal, respectivamente. Los cortes de la planta se tiñeron con azul de toluidina durante 2 min con objeto de facilitar la apreciación de los diferentes tejidos.



**Figura 22.** Estructura secundaria de tallo y raíz de olivo. A) Corte transversal de tallo. B) Amplificación de una zona de la imagen A con indicación de los diferentes tejidos: parénquima medular (PM), xilema (X), cambium vascular (CV), floema (F), fibrillas (FI), parénquima cortical (PC), colénquima (CL), súber (S) y epidermis (E). C) Corte longitudinal de raíz con indicación de las regiones del tejido vascular (TV), el córtex (CR) y la epidermis (E).

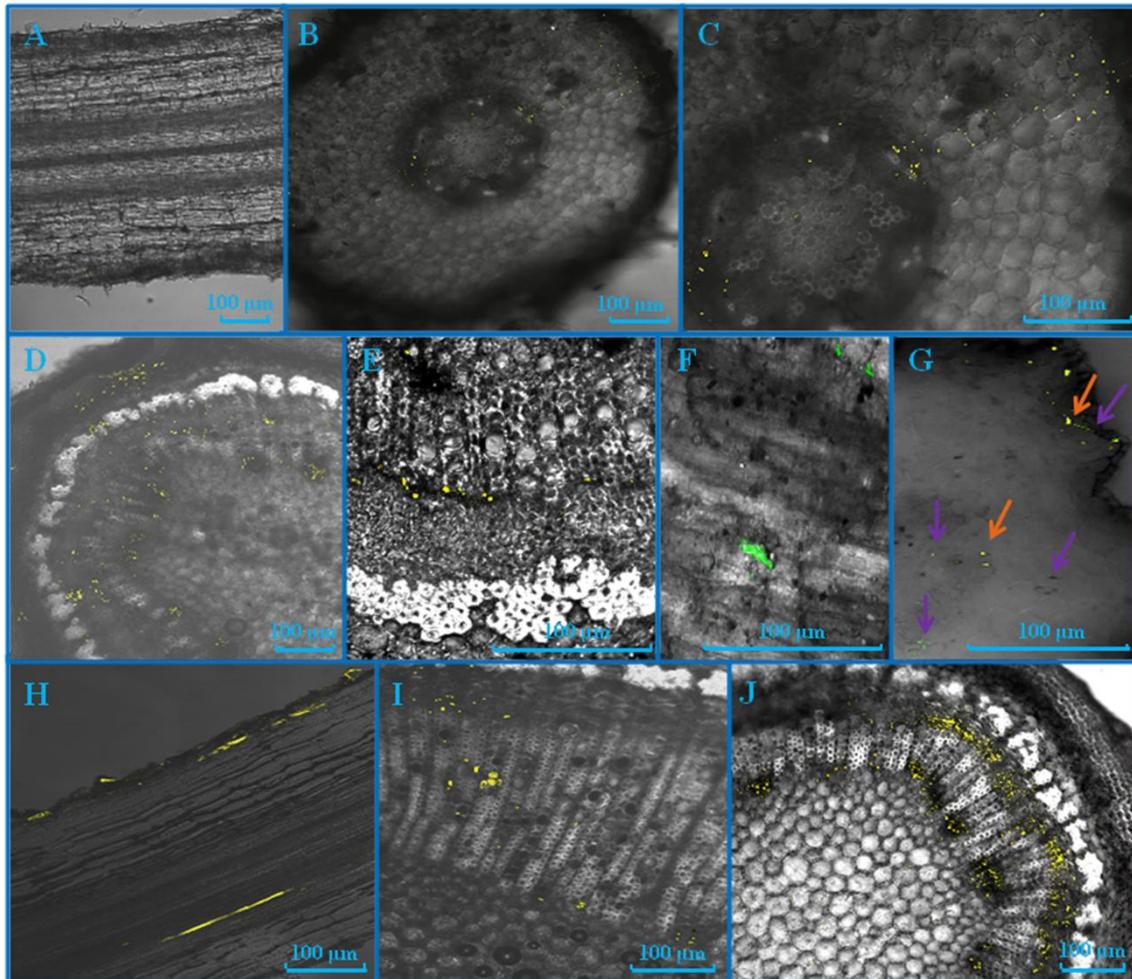
En el corte de tallo se observan (desde el centro hacia el exterior) los siguientes tejidos: parénquima medular (células de diámetro más grandes), xilema primario y secundario (células de diámetro menor que las anteriores, con paredes engrosadas y, más o menos, alineadas radialmente), cambium vascular (capa de células que originará el xilema y floema secundarios), floema secundario y primario (células pequeñas y, más

o menos, alineadas radialmente), fibrillas (células con pared gruesa originadas a partir de restos del floema primario y formando una capa discontinua), parénquima cortical (protege los tejidos conductores), colénquima (células pequeñas con paredes gruesas), súber (aún joven, constituido por tres capas de células de paredes delgadas) y epidermis (la capa exterior que se acabará desprendiendo). En el corte longitudinal de raíz solo se discriminan las tres grandes regiones que forman el tejido vascular, el córtex y la epidermis.

Para comparar los procesos de colonización por *V. dahliae* D V138-Yh de plántones de olivo y clones de acebuche con distinta susceptibilidad al patógeno y, tratados o no previamente con la cepa *T. harzianum* GFP22 se muestrearon el sistema radical y las partes baja, media y alta del tallo en un curso temporal desde el día 1 y 50 después de la inoculación (dip) con V138-Yh. En las Figs. 23 a 26 se presentan imágenes de microscopía confocal láser representativas del proceso de colonización en plántones de olivo de la variedad Picual y en los clones de acebuche Ac-15 (susceptible), y Ac-4 y Ac-18 (resistentes), respectivamente. Para evitar la autofluorescencia de la planta así como el uso extra de colorantes para distinguir los tejidos vegetales y la morfología de sus células, todas las imágenes se tomaron utilizando el contraste de fases.

De forma general, se detectó la cepa V138-Yh en muestras de raíz y tallo del tratamiento T2 (*V. dahliae* D V138-Yh) en todos los plántones testados para los 4 tipos diferentes de material vegetal utilizado (Figs. 23B-D, 24B-D, 25B y 26B-E), pero siempre en mayor medida en “Picual” y “Ac-15” que en los clones Ac-4 y Ac-18, y se observó la presencia de *T. harzianum* GFP22 en muestras de raíz del tratamiento T3 (*T. harzianum* GFP22) para los plántones de “Picual”, “Ac-15”, “Ac-4” y “Ac-18” (Figs. 23F, 24E, 25D y 26F), pero en ninguna de las muestras de tallo. Por otro lado, ambos hongos se observaron en muestras de raíz del tratamiento T4 (*T. harzianum* GFP22 + *V. dahliae* D V138-Yh) de los cuatro tipos de plántones utilizados (Figs. 23G y H, 24F y G, 25C-E y 26F-H) y, a su vez, V138-Yh se detectó en todas las muestras de tallo pero, al igual que lo observado para el tratamiento T2, era más abundante en “Picual” y “Ac-15” que en los clones Ac-4 y Ac-18 (Figs. 23I y J, 24H e I, 25F y 26I).

A los 11 días de la inoculación con *V. dahliae* D V138-Yh (11-dip), el patógeno había alcanzado los haces vasculares de la raíz de plántones de “Picual” y de “Ac-15” del tratamiento T2 (*V. dahliae* D V138-Yh) (Figs. 23B y C), pero en los clones Ac-4 y Ac-18, donde se observaba solo en epidermis y córtex a este tiempo y también a 15-dip. En muestras de raíz de “Ac-18” de 28-dip se observaba que el patógeno no había accedido todavía a los vasos de este órgano (Fig. 26C). En las muestras de tallo tomadas entre 31 y 50-dip del tratamiento T2, V138-Yh se detectaba en tallo alto de “Ac-15” a los 36-dip (Figs. 24C y D) y de “Picual” a los 39-dip (Fig. 24D), mientras que no se detectó en muestras de las partes inferior, media y superior del tallo de los clones Ac-4 y Ac-18 a estos tiempos. Sin embargo, se detectó el patógeno en muestras de tallo bajo, medio y alto del tratamiento T2 de “Ac-4” y “Ac-18” a los 50-dip (Figs. 26D y E).

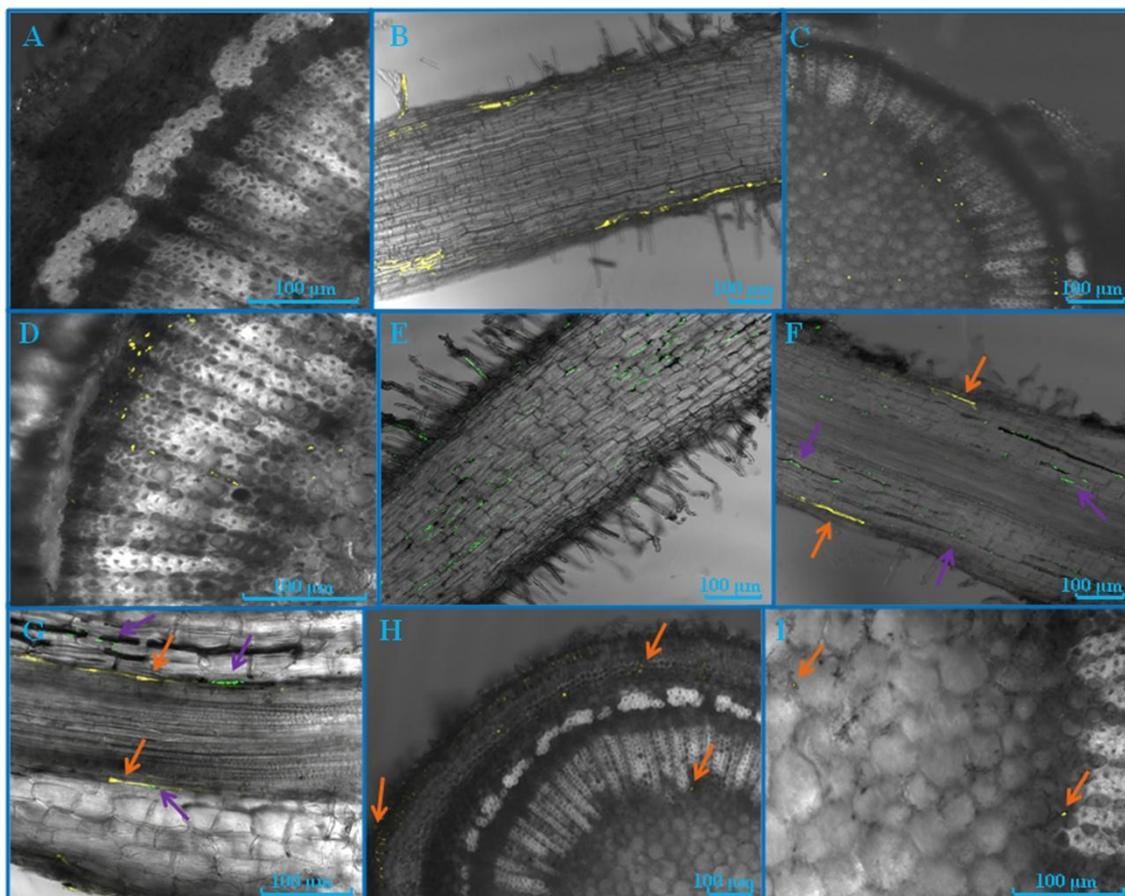


**Figura 23.** Proceso de colonización de olivo “Picual” por *V. dahliae* D V138-Yh en plantones pretratados con *T. harzianum* GFP22. Las fechas de color naranja señalan al patógeno (fluorescencia amarilla) y las de color morado al antagonista (fluorescencia verde). Las hifas de ambos hongos se muestran en secciones, longitudinal o transversal, de raíz o tallo de plantones del ensayo detallado en el Apartado 13.1 de Materiales y Métodos, que corresponden a los tratamientos T1 (control), T2 (V138-Yh), T3 (GFP22) y T4 (GFP22+V138-Yh). Los tiempos se refieren a días después de la inoculación con el patógeno (dip) cuando proceda según tratamiento. A) Corte longitudinal de raíz de 22-dip para T1. B) Corte transversal de raíz de 11-dip para T2. C) Ampliación de una zona de B. D y E) Corte transversal de tallo alto de 39-dip para T2. F) Corte longitudinal de raíz de 50-dip para T3. G) Corte transversal de raíz de 11-dip para T4. H) Corte longitudinal de raíz de 15-dip para T4. I) Corte transversal de tallo alto de 43-dip para T4. J) Corte transversal de tallo alto de 50-dip para T4.

Para analizar la colonización por la cepa *T. harzianum* GFP22 de olivo “Picual” y de los clones de acebuche Ac-15, Ac-4 y Ac-18, se tomaron muestras de raíz del tratamiento T3 entre 7 y 62 días después de la inoculación (62-día). No se observaron diferencias en la colonización de los cuatro tipos de plantones utilizados, a su vez, el hongo nunca alcanzó el tejido vascular y parecía que la población se mantenía a niveles similares a los observados a los 11-día, al menos, a los 62-día (Fig. 23F).

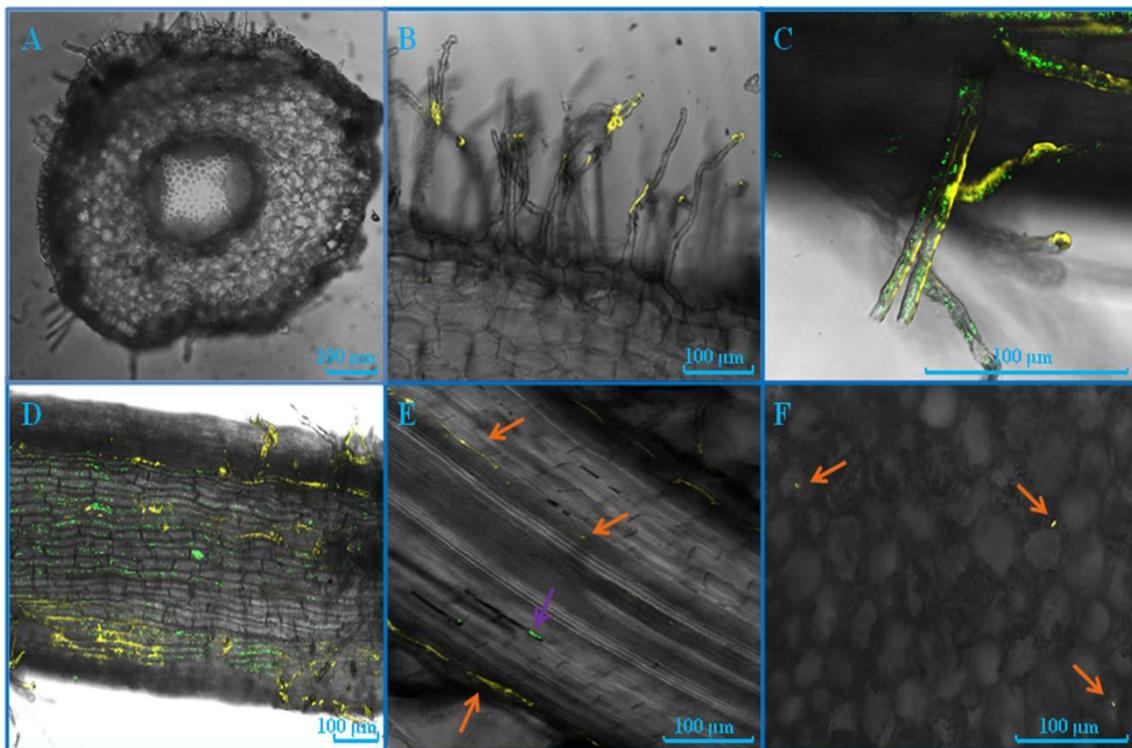
Para monitorizar la colonización por *V. dahliae* D de plantas de olivo previamente tratadas con *T. harzianum* GFP22 (aplicado 12 días antes de inocular el patógeno)

V138-Yh en, se tomaron muestras de raíz y tallo de plántones del tratamiento T4 (*T. harzianum* GFP22 + *V. dahliae* D V138-Yh) entre 11 y 50-dip. El patógeno se observó en muestras de raíz de olivo “Picual” a los 11-dip (Fig. 23G), pero no en las de los clones Ac-15, Ac-4 y Ac-18. A su vez, el patógeno había alcanzado los haces vasculares de las muestras de raíz de olivo “Picual” 15-dip (Fig. 23H) y a 20-dip infectaba los vasos radicales de “Ac-15” (Fig. 24F), y trataba de acceder a los vasos de “Ac-4” y “Ac-18” a los 20 y 21-dip, respectivamente (Figs. 25E y 26H).

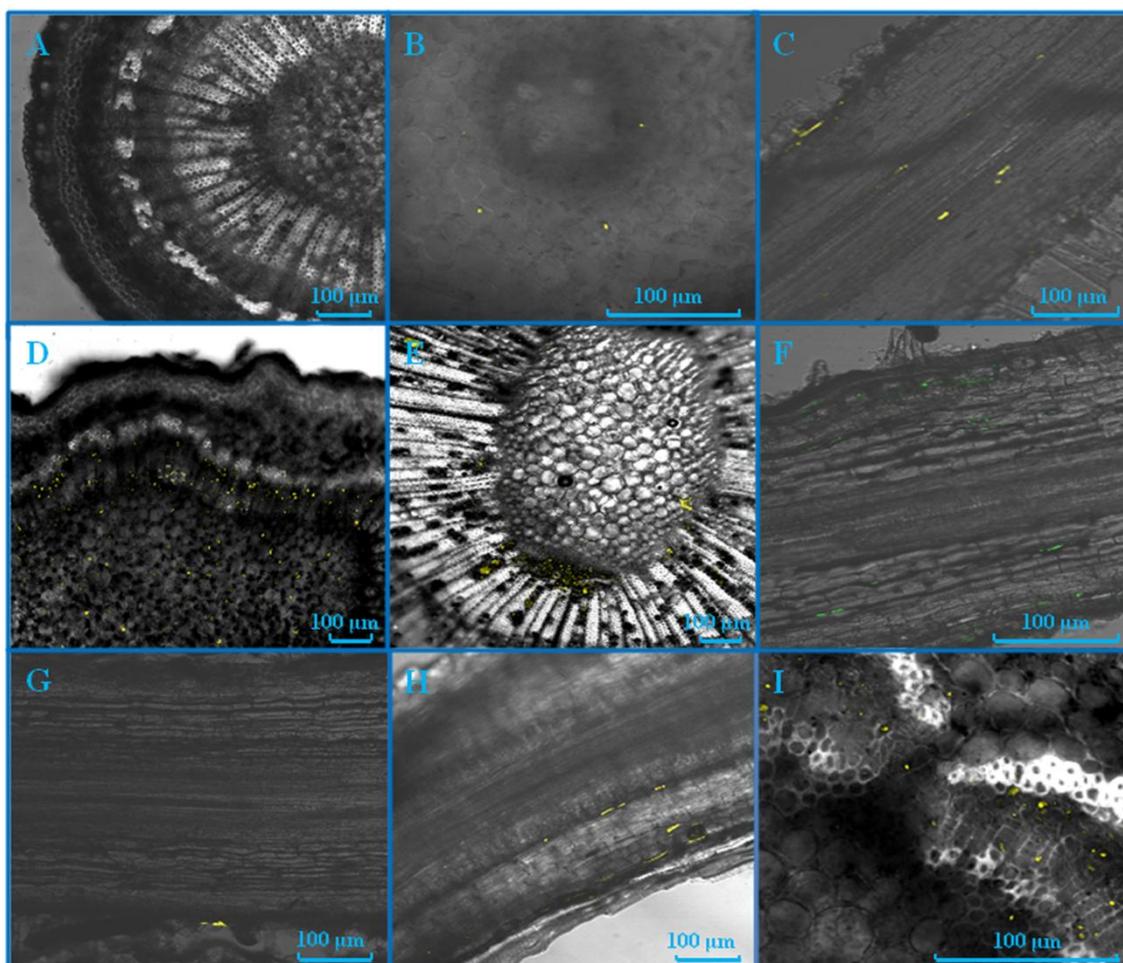


**Figura 24.** Proceso de colonización del clon de acebuche susceptible Ac-15 por *V. dahliae* D V138-Yh en plántones pretratados con *T. harzianum* GFP22. Las fechas de color naranja señalan al patógeno (fluorescencia amarilla) y las de color morado al antagonista (fluorescencia verde). Las hifas de ambos hongos se muestran en secciones, longitudinal o transversal, de raíz o tallo de plántones del ensayo detallado en el Apartado 13.1 de Materiales y Métodos, que corresponden a los tratamientos T1 (control), T2 (V138-Yh), T3 (GFP22) y T4 (GFP22+V138-Yh). Los tiempos se refieren a días después de la inoculación con el patógeno (dip) cuando proceda según tratamiento. A) Corte transversal de tallo 36-dip para T1. B) Plano superficial de corte longitudinal de raíz de 20-dip para T2. C) Corte transversal de tallo alto de 36-dip para T2. D) Ampliación de una zona de C. E) Plano superficial de corte longitudinal de raíz de 20-dip para T3. F y G) Corte longitudinal de raíz de 20-dip para T4. H) Corte transversal de tallo alto de 37-dip para T4. I) Ampliación de parénquima medular y xilema de H.

El patógeno se observó en muestras de tallo alto de olivo “Picual” (Fig. 23I), “Ac-15” y “Ac-4” (Figs. 24H e I y 25F) tomadas entre 37 y 43-dip; si bien, en todos los casos, la cantidad del patógeno era menor que la observada en las muestras del tratamiento T2 (*V. dahliae* D V138-Yh) tomadas a tiempos similares, pero existían diferencias entre el material vegetal: “Picual” presentaba la mayor cantidad de V138-Yh, seguido de cerca por “Ac-15” y era mucho menor para “Ac-4”. En “Ac-18”, el patógeno solo se observó en las muestras de tallo alto tomadas a 50-dip (Fig. 26I), mientras que a ese mismo tiempo se observaba una elevada colonización por el patógeno del tallo alto de “Picual” (Fig. 23J).



**Figura 25.** Proceso de colonización del clon resistente de acebuche Ac-4 por *V. dahliae* D V138-Yh en plantones pretratados con *T. harzianum* GFP22. Las fechas de color naranja señalan al patógeno (fluorescencia amarilla) y las de color morado al antagonista (fluorescencia verde). Las hifas de ambos hongos se muestran en secciones, longitudinal o transversal, de raíz o tallo de plantones del ensayo detallado en el Apartado 13.1 de Materiales y Métodos, que corresponden a los tratamientos T1 (control), T2 (V138-Yh), T3 (GFP22) y T4 (GFP22+V138-Yh). Los tiempos se refieren a días después de la inoculación con el patógeno (dip) cuando proceda según tratamiento. A) Corte transversal de raíz de 17-dip para T1 B) Pelos radicales de 20-dip para T2. C) Pelos radicales de 20-dip para T4. D) Plano superficial de corte longitudinal de raíz de 20-dip para T4. E) Corte longitudinal de raíz de 20-dip para T4. F) Parénquima medular de corte transversal de tallo alto de 43-dip para T4.



**Figura 26.** Proceso de colonización del clon resistente de acebucho Ac-18 por *V. dahliae* D V138-Yh en plantones pretratados con *T. harzianum* GFP22. Las hifas de ambos hongos se muestran en secciones, longitudinal o transversal, de raíz o tallo de plantones del ensayo detallado en el apartado 13.1 de Materiales y Métodos, que corresponden a los tratamientos T1 (control), T2 (V138-Yh), T3 (GFP22) y T4 (GFP22+V138-Yh). Los tiempos se refieren a días después de la inoculación con el patógeno (dip) cuando proceda según tratamiento. A) Corte transversal de tallo de 39-dip para T1. B) Corte transversal de raíz de 11-dip para T2. C) Corte longitudinal de tallo de 28-dip para T2. D y E) Corte transversal de tallo alto y bajo respectivamente de 50-dip para T2. F) Corte longitudinal de raíz de 29-dip para T3. G) Corte longitudinal de raíz de 15-dip para T4. H) Corte longitudinal de raíz de 21-dip para T4. I) Corte transversal de tallo alto de 50-dip para T4.

En la Tabla 19 se presentan los resultados de reaislamiento de *V. dahliae* D V138-Yh en el material vegetal del ensayo *in vivo* descrito en el Apartado 13.1 de Materiales y Métodos. Se utilizaron muestras de hoja, y de tallo bajo, medio y alto, recogidas a 30 y 43-dip, respectivamente, procedentes de plantones de los cuatro tratamientos considerados en el estudio de microscopía confocal. *Verticillium dahliae* V138-Yh se reaisló de las tres zonas de tallo muestreadas de los plantones de olivo “Picual” y del clon de acebucho Ac-15 para los tratamientos T2 (*V. dahliae* D V138-Yh) y T4 (*T. harzianum* GFP22 + *V. dahliae* D V138-Yh), mientras que para “Ac-4” el patógeno se reaisló de las tres zonas de tallo del tratamiento T2 y solo de tallo bajo del tratamiento T4, no reaislándose de tallos del clon Ac-18 ni para ninguno de estos dos tratamientos.

El patógeno tampoco se reisoló en las muestras control (T1) ni en las del tratamiento T3 (*T. harzianum* GFP22) en los cuatro tipos de material vegetal utilizado. En olivo “Picual” no se detectaron diferencias entre tallo bajo, medio y alto con el tratamiento T2, pero con el tratamiento T4 se reisoló el patógeno en menor medida en tallo alto respecto a medio y bajo.

**Tabla 19.** Efecto del genotipo de la planta, el tratamiento con *T. harzianum* GFP22 y la zona de tallo (alta, media y baja) muestreada en la intensidad de la colonización\* de *V. dahliae* V138-Yh en plántones de olivo “Picual” y de los clones de acebuche Ac-4, Ac-15 y Ac-18.

<u>Tratamiento</u>	<u>Picual</u>			<u>Ac-15</u>			<u>Ac-4</u>			<u>Ac-18</u>		
	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>B</u>
<b>T1 (Control)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>T2 (V138-Yh)</b>	97	100	100	4	74	100	17	29	38	0	0	0
<b>T3 (GFP22)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>T4 (V138-Yh+GFP22)</b>	73	100	100	40	88	89	0	0	5	0	0	0

\*Los datos se expresan como porcentaje calculado sobre los 24 fragmentos de 0,5 a 1 cm de longitud testados por tratamiento y zona muestreada (12 fragmentos por zona y planta, de dos plantas).

El patógeno tampoco se reisoló en hoja de los clones Ac-4y Ac-18 en ninguno de los cuatro tratamientos considerados. Sin embargo, en plántones del tratamiento T2 se consiguió un reisolamiento del 28 y 13% en las muestras de hoja de “Picual” y del clon Ac-15, respectivamente, y del 8 y 13% en dichos plántones con el tratamiento T4.

En los clones de acebuche Ac-4 y Ac-15 se determinaron los niveles de clorofila, en hojas de rama baja, media y alta a un tiempo de 23-dip utilizando un medidor de clorofila SPAD-502 Plus. En la Tablas 20 y 21 se presentan los valores medios obtenidos a los 23 días de la inoculación con el patógeno (no aplicado para el caso de los tratamientos T1 y T3) en las distintas zonas de muestreo de “Ac-15” y “Ac-4”, respectivamente, con los cuatro tratamientos considerados. Para ambos clones, los mayores niveles de clorofila se detectaron en hojas de rama media y los menores en hojas de rama alta. Sin embargo, solo el patógeno afectaba a los niveles de clorofila en hojas de rama alta de “Ac-15” pues los valores fueron significativamente menores con el tratamiento T2 (*V. dahliae* D V138-Yh) que aquellos obtenidos en el control (T1). En el clon Ac-4, el patógeno redujo significativamente los niveles de clorofila en hojas de rama baja, media y alta respecto al control, pero también el antagonista redujo significativamente los niveles de clorofila en las hojas de rama alta respecto al control aunque en las hojas de esta zona de los plántones era significativamente mayor la reducción que causaba la cepa V138-Yh que la ocasionada por la cepa GFP22. Para ninguno de los dos clones se observaron diferencias significativas en los valores de clorofila obtenidos en hoja de rama baja, media o alta entre los tratamientos T3 y T4.

**Tabla 20.** Efecto del tratamiento con *T. harzianum* GFP22 y del nivel de hoja muestreada en rama alta, media y baja, en los niveles de clorofila\* de plántones de acebuche Ac-15 infestados artificialmente con *V. dahliae* V138-Yh.

<u>Tratamiento</u>	<u>Hoja</u>		
	<u>Alta</u>	<u>Media</u>	<u>Baja</u>
<b>T1 (Control)</b>	64,9 ± 0,62 a	78,06 ± 4,15 a	71,04 ± 2,88 a
<b>T2 (V138-Yh)</b>	50,45 ± 8,82 b	75,46 ± 2,91 a	65,97 ± 7,15 a
<b>T3 (GFP22)</b>	62,87 ± 5,71 ab	78,49 ± 2,97 a	71,24 ± 4,99 a
<b>T4 (V138-Yh+GFP22)</b>	55,00 ± 3,06 ab	78,31 ± 4,19 a	67,97 ± 3,17 a

\*Los valores son media de 60 medidas para cada condición considerada (dos puntos por hoja de 10 hojas en tres plantas). Dentro de una misma columna valores seguidos por una misma letra indica que no existen diferencias significativas entre ellos.

**Tabla 21.** Efecto del tratamiento con *T. harzianum* GFP22 y el nivel de hoja muestreada en rama alta, media y baja, en los niveles de clorofila\* de plántones de acebuche Ac-4 infestados artificialmente con *V. dahliae* V138-Yh.

<u>Tratamiento</u>	<u>Hoja</u>		
	<u>Alta</u>	<u>Media</u>	<u>Baja</u>
<b>T1 (Control)</b>	79,17 ± 1,52 a	85,02 ± 2,00 a	80,3 ± 2,88 a
<b>T2 (V138-Yh)</b>	64,85 ± 4,05 c	78,88 ± 3,52 b	70,28 ± 5,86 b
<b>T3 (GFP22)</b>	72,42 ± 2,94 ab	83,49 ± 1,72 ab	75,42 ± 1,00 ab
<b>T4 (V138-Yh+GFP22)</b>	70,49 ± 3,01 bc	81,82 ± 0,78 ab	75,17 ± 2,56 ab

\*Los valores son media de 60 medidas para cada condición considerada (dos puntos por hoja de 10 hojas en tres plantas). Dentro de una misma columna valores seguidos por una misma letra indica que no existen diferencias significativas entre ellos.

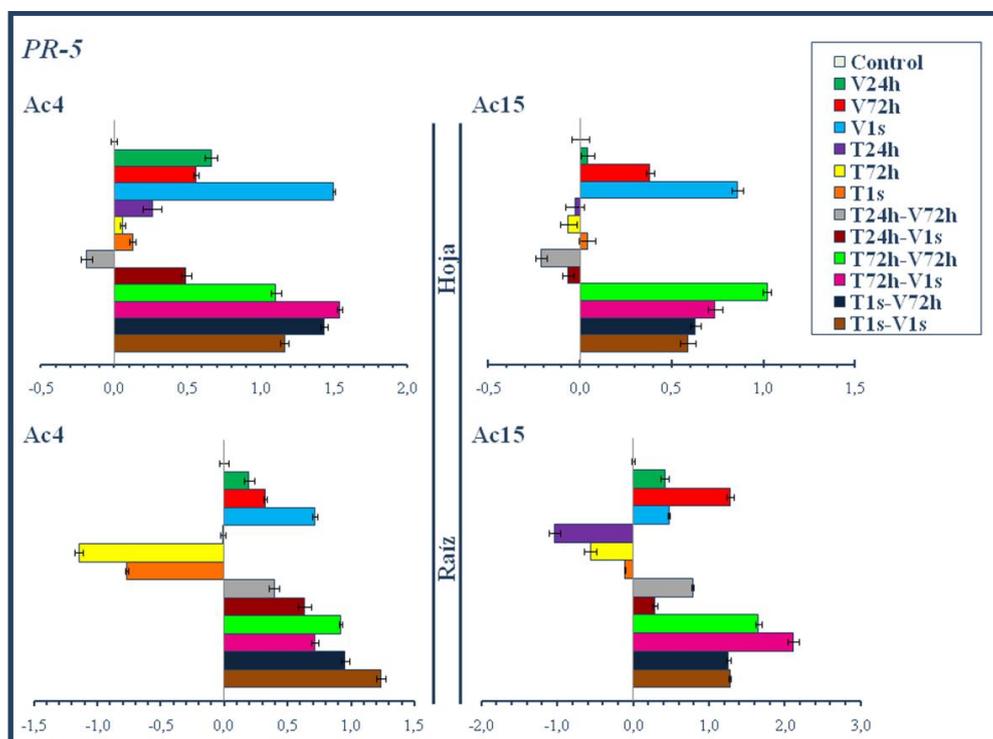
#### **4. SEÑALIZACIÓN DE DEFENSA CONTRA *Verticillium dahliae* Y *Trichoderma harzianum* EN CLONES DE ACEBUCHE**

Para estudiar los cambios en la señalización de los mecanismos defensivos inducidos por la infección de *V. dahliae* D V-138I y el antagonista *T. harzianum* T34 en plántones de acebuche resistentes o susceptibles al patógeno, y cómo influiría sobre ellos que la cepa antagonista se inoculara uno o varios días antes que *V. dahliae* D V-138I, se analizaron los perfiles de expresión de seis genes marcadores de biosíntesis o señalización hormonal mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 7, en muestras recogidas del material vegetal del ensayo *in vivo* descrito en el Apartado 11.4 de Materiales y Métodos. Se utilizaron, separadamente, muestras de raíces y hojas de los clones de acebuche Ac-4 y Ac-15 de los distintos tratamientos (i.e., control, inoculación solo con *V. dahliae* D V-138I, inoculación solo con *T. harzianum* T34, e inoculación con T34 y V-138I), que se recogieron a diferentes tiempos en un curso temporal de la infección según se detalla en la Fig. 10 de Materiales y Métodos.

Dichas muestras se emplearon para analizar los cambios defensivos asociados a respuestas de defensas local y sistémica en un intervalo tiempo de 24 h a 1 semana.

La expresión relativa de los genes que codifican la proteína relacionada con patogenicidad (PR)-5, una fenilalanina-amonio liasa (PAL), el factor de transcripción WRKY4, la 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS)7, la proteína de síntesis de auxinas IAA9 y el factor de transcripción EIN3, en las raíces y hoja de los clones Ac-4 y Ac-15, altamente resistente y susceptible *V. dahliae* D V-138I, respectivamente, se presenta en las Figs. 27 a 32.

El aislado V-138I indujo la expresión del gen *PR-5* en raíces y hojas de “Ac-4” y “Ac-15” y, de forma general, los mayores niveles se produjeron a la semana de la inoculación de las plantas (Fig. 27).

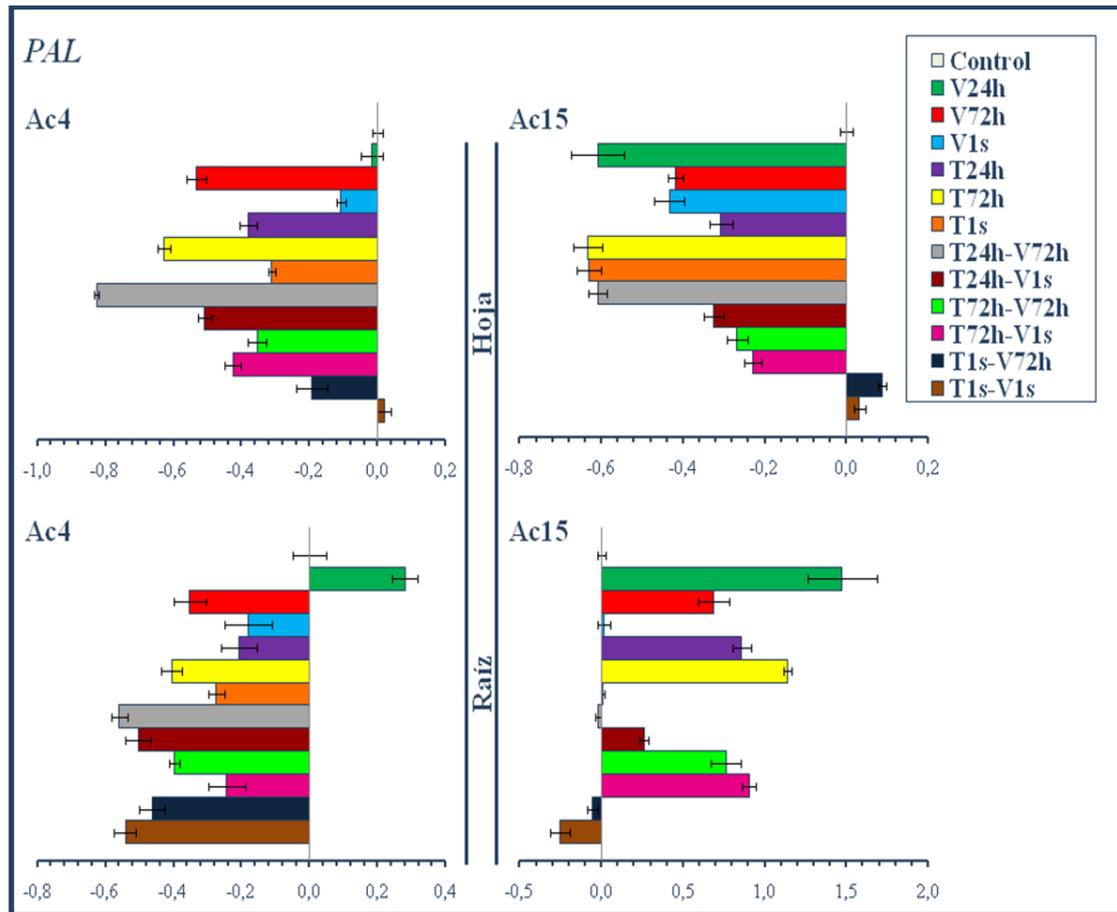


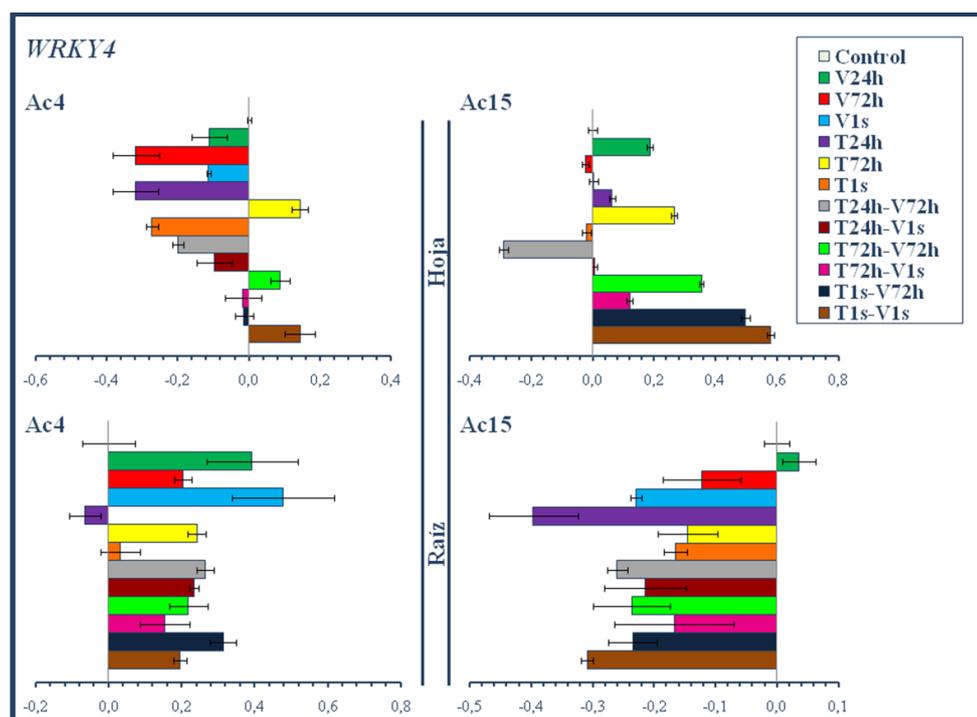
**Figura 27.** Expresión relativa del gen *PR-5* en raíces y hojas de los clones de acebuches Ac-4 y Ac-15, determinada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en un curso temporal tras la inoculación individual o conjunta con *V. dahliae* D V-138I y *T. harzianum* T34. La identificación de los tiempos de muestreo es como sigue, V24h, V72h, V1s: 24 h, 72 h y 1 semana tras la inoculación con V-138I; T24h, T72h, T1s: 24 h, 72 h, 1 semana tras la inoculación con T34; T24h-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 24 h antes con T34; T24h-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I en planta inoculadas 24 h antes con T34; T72h-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 72 h antes con T34; T72h-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 72 h antes con T34; y T1s-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 1 semana antes con T34; T1s-T1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I de plantas inoculadas 1 semana antes con T34. Como control de carga se utilizó el gen de la actina de olivo. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de la condición control, no inoculadas ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ ), y los resultados se expresan como  $\log_{10}$  de la expresión relativa. Las barras de error en cada panel y condición indican la desviación estándar en tres replicas técnicas realizadas sobre una mezcla del material biológico procedente de cuatro plantas.

Por otro lado, la inoculación de dichos clones con la cepa T34 causó, al menos a los tiempos más alejados desde la inoculación, infrarregulación de este gen en las raíces de “Ac-4” y “Ac-15” y, paralelamente, sobrerregulación solo en hojas de “Ac-4”. De forma general, se detectó sobrerregulación de dicho gen en las raíces de “Ac-4” y “Ac-15” tras la inoculación con V-138I de plantas pretratadas con la cepa T34. Y, esta sobrerregulación también se observó en las hojas de ambos clones cuando la inoculación con V-138I se había realizado 72 h o 1 semana después de la inoculación con T34, independientemente del tiempo transcurrido entre las dos inoculaciones.

En la mayoría de las muestras de raíces y hojas de “Ac-4” y también de hojas de “Ac-15” se observó una infrarregulación de *PAL*, un gen de la biosíntesis de SA (Fig. 28). Sin embargo, este gen estuvo sobrerregulado en muestras de raíces de “Ac-4” recogidas a las 24 h de la inoculación con el patógeno. En hojas de “Ac-15”, la infrarregulación de *PAL* disminuyó cuando aumentó el tiempo transcurrido entre la inoculación con el patógeno de plantas preinoculadas con T34. Contrariamente a lo observado en hojas de “Ac-15”, la inoculación con V138-I o T34 indujo la expresión de *PAL* en raíces de “Ac-15” a los dos tiempos de muestreo más cercanos a la inoculación (24 y 72 h), mientras que se detectó una respuesta ondulante si la inoculación con el patógeno tuvo lugar en plantones preinoculados con el antagonista, alcanzando mayores niveles cuando V-138I se inoculó 72h después que T34 comparada con la que se produjo cuando esta tuvo lugar a las 24 h o 1 semana.

Los niveles de expresión del gen que codifica el factor de transcripción WRKY4 estuvieron sobrerregulados en todas las muestras de raíces de “Ac-4”, excepto en las tomadas a los tiempos más cercanos y alejados (24 h y 1 semana) de la inoculación con T34, para los que no se detectaron cambios en la expresión (Fig. 29). El perfil de expresión del gen en raíces de “Ac-15” fue casi contrario al detectado en raíces de “Ac-4” ya que se observó infrarregulación bajo casi todas las condiciones utilizadas en el ensayo. Sin embargo, mientras que la bajada en los niveles de expresión del gen asociada con la inoculación con el patógeno aumentó con el transcurso del tiempo, la infrarregulación causada por la inoculación con el antagonista disminuyó con el paso del tiempo. De forma general, los perfiles de expresión observados en muestras de hojas de “Ac-4” y “Ac-15” presentaron diferencias entre ellos y, a su vez, con los detectados en muestras de raíces de ambos clones. El gen estuvo infrarregulado en hojas de “Ac-4” a los tres tiempos de muestreo tras la inoculación con el patógeno, pero T34 indujo el gen a las 72 h, hecho que coincidió con lo observado en muestras de raíces de “Ac-4” de la misma condición. A su vez, solo se observó una infrarregulación del gen cuando la inoculación con el patógeno se realizó a las 24 h de la preinoculación con el antagonista, independientemente del tiempo transcurrido desde la inoculación del patógeno (72 h o 1 semana). Sin embargo, se detectó sobrerregulación en hojas de “Ac-15” cuando la planta se inoculó con el patógeno 72 h o 1 semana después que el antagonista.

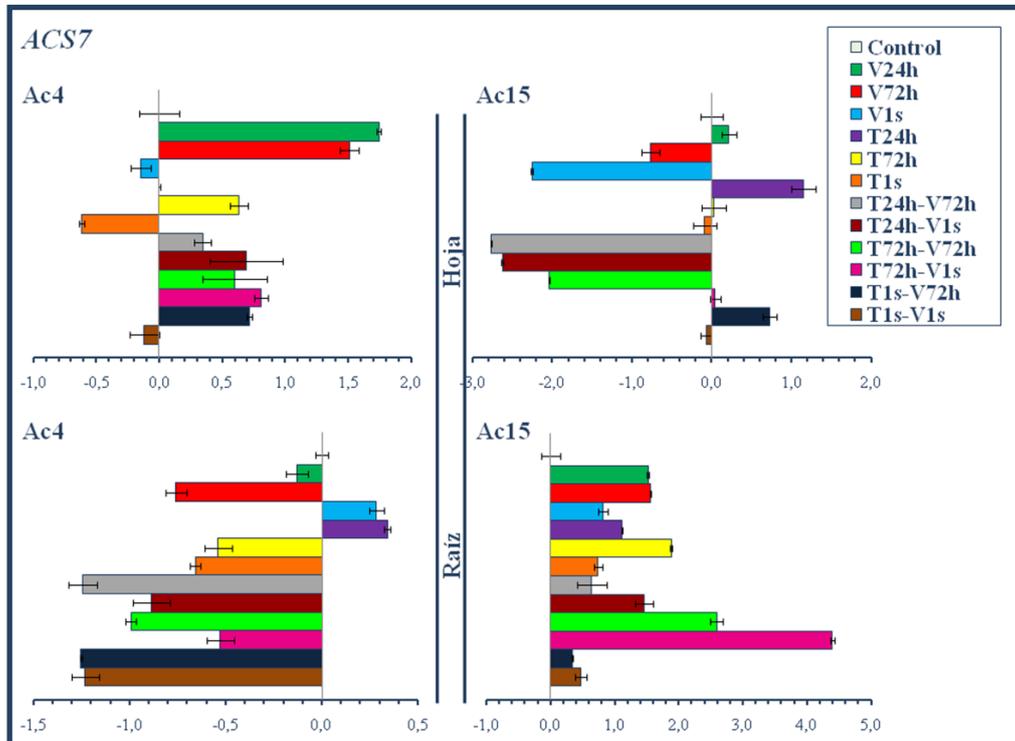




**Figura 29.** Expresión relativa del gen *WRKY4* en raíces y hojas de los clones de acebuche Ac-4 y Ac-15, determinada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en un curso temporal tras la inoculación individual o conjunta con *V. dahliae* D V-138I y *T. harzianum* T34. La identificación de los tiempos de muestreo es como sigue, V24h, V72h, V1s: 24 h, 72 h y 1 semana tras la inoculación con V-138I; T24h, T72h, T1s: 24 h, 72 h, 1 semana tras la inoculación con T34; T24h-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 24 h antes con T34; T24h-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I en planta inoculadas 24 h antes con T34; T72h-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 72 h antes con T34; T72h-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 72 h antes con T34; y T1s-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 1 semana antes con T34; T1s-T1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I de plantas inoculadas 1 semana antes con T34. Como control de carga se utilizó el gen de la actina de olivo. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de la condición control, no inoculadas ( $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ ), y los resultados se expresan como  $\log_{10}$  de la expresión relativa. Las barras de error en cada panel y condición indican la desviación estándar en tres replicas técnicas realizadas sobre una mezcla del material biológico procedente de cuatro plantas.

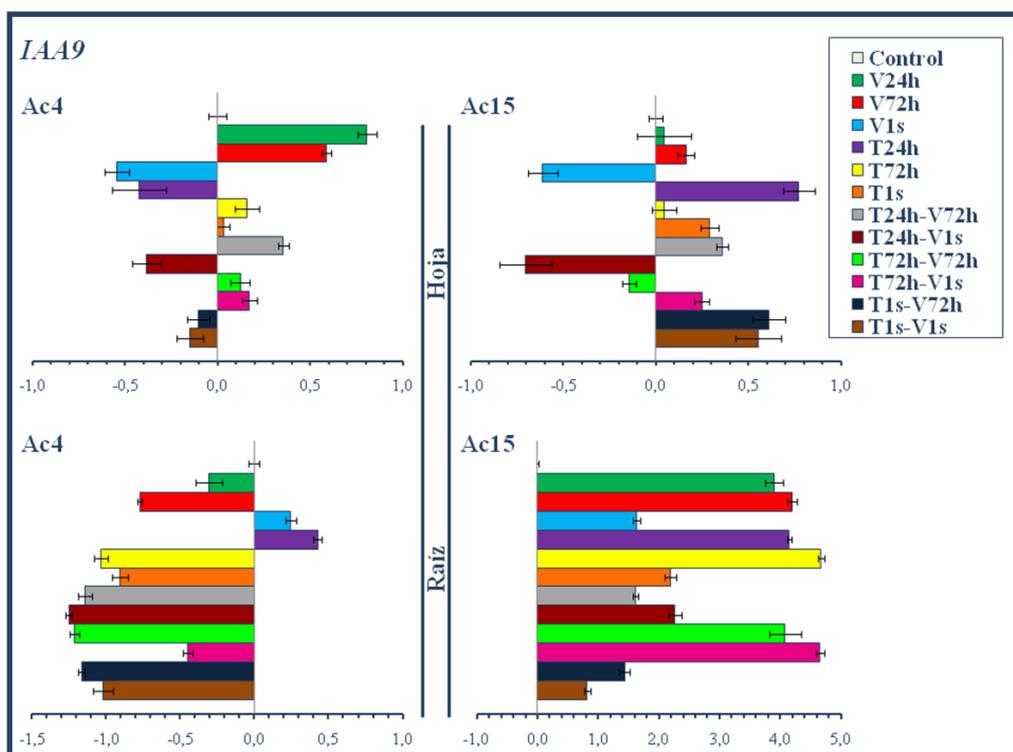
De forma general, se observó sobreexpresión de *ACS7*, gen que codifica una ACC sintasa relacionada con la ruta de biosíntesis de ET, en todas las muestras de raíces del clon susceptible Ac-15 e infraregulación en las procedentes del clon resistente Ac-4, excepto en raíces muestreadas 1 semana después de la inoculación con V-138I o 24 h después de la inoculación con T34 (Fig. 30). En las muestras de hojas del clon Ac-4 se observó un perfil de expresión contrario al detectado en la raíz de esos plantones, con excepción de la infraregulación detectada en las hojas muestreadas 1 semana después de la inoculación con T34. En el caso de las hojas del clon Ac-15, se observó una disminución en los niveles de expresión del gen *ACS7* en el curso de la infección, desde las 24 h a 1 semana de la inoculación con V-138I o con T34. Sin embargo, la infraregulación fue mayor cuando la inoculación con el patógeno se realizó

24 h después de la inoculación de T34, independientemente del tiempo transcurrido desde la inoculación del patógeno (72 horas o 1 semana); por el contrario, cuando el tiempo transcurrido desde la inoculación con T34 fue superior a 72 h, el nivel de expresión de este gen varió entre las hojas muestreadas 72 h y 1 semana después de la inoculación con el patógeno.



Los niveles de expresión del gen *IAA9*, relacionado con la biosíntesis de auxinas, fueron similares a los observados para el gen *ACS7* en muestras de raíces de los clones Ac-4 y Ac-15 (Fig. 31). Sin embargo, los perfiles de expresión de este gen en hojas de

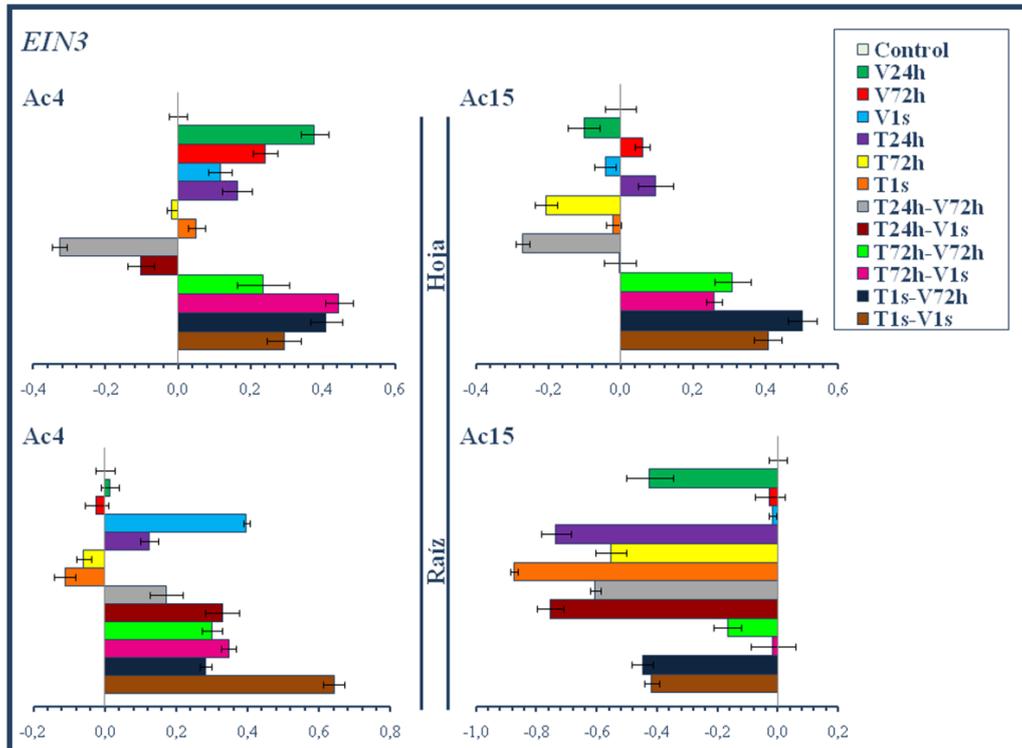
“Ac-4” y “Ac-15” fueron muy diferentes entre sí, y también dispares respecto a los observados en las muestras de raíces de ambos clones.



**Figura 31.** Expresión relativa del gen *IAA9* en raíces y hojas de los clones de acebuche Ac-4 y Ac-15, determinada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en un curso temporal tras la inoculación individual o conjunta con *V. dahliae* D V-138I y *T. harzianum* T34. La identificación de los tiempos de muestreo es como sigue, V24h, V72h, V1s: 24 h, 72 h y 1 semana tras la inoculación con V-138I; T24h, T72h, T1s: 24 h, 72 h, 1 semana tras la inoculación con T34; T24h-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 24 h antes con T34; T24h-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I en planta inoculadas 24 h antes con T34; T72h-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 72 h antes con T34; T72h-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 72 h antes con T34; y T1s-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 1 semana antes con T34; T1s-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I de plantas inoculadas 1 semana antes con T34. Como control de carga se utilizó el gen de la actina de olivo. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de la condición control, no inoculadas ( $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ ), y los resultados se expresan como  $\log_{10}$  de la expresión relativa. Las barras de error en cada panel y condición indican la desviación estándar en tres replicas técnicas realizadas sobre una mezcla del material biológico procedente de cuatro plantas.

Los perfiles de expresión del gen *EIN3* que codifica un factor de transcripción de la ruta de ET en muestras de raíces de “Ac-4” fueron, de forma general, contrarios a los de “Ac-15”, excepto por la infrarregulación observada en las raíces de ambos clones muestreadas a los tiempos más prolongados tras la inoculación con T34 (Fig. 32). Por otro lado, la inoculación con V-138I indujo sobrerregulación de *EIN3* en las hojas de “Ac-4”, pero no originó cambios en las hojas de “Ac-15”. La respuesta inducida por la inoculación con T34 fue ondulante en las hojas de ambos clones, ya que los mayores y

menores niveles de expresión se detectaron a las 24 y 72 h de la inoculación con el antagonista en “Ac-4” y “Ac-15”, respectivamente. En las hojas de plántones de “Ac-4” y “Ac-15” preinoculadas con T34 solo se observó sobrerregulación del gen cuando la inoculación con el patógeno se había realizado 72 h o 1 semana después que con el antagonista.



**Figura 32.** Expresión relativa del gen *EIN3* en raíces y hojas de los clones de acebuche Ac-4 y Ac-15, determinada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en un curso temporal tras la inoculación individual o conjunta con *V. dahliae* D V-138I y *T. harzianum* T34. La identificación de los tiempos de muestreo es como sigue, V24h, V72h, V1s: 24 h, 72 h y 1 semana tras la inoculación con V-138I; T24h, T72h, T1s: 24 h, 72 h, 1 semana tras la inoculación con T34; T24h-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 24 h antes con T34; T24h-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I en planta inoculadas 24 h antes con T34; T72h-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 72 h antes con T34; T72h-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 72 h antes con T34; y T1s-V72h, 72 h después de la inoculación con V-138I de planta inoculadas 1 semana antes con T34; T1s-V1s, 1 semana después de la inoculación con V-138I de plantas inoculadas 1 semana antes con T34. Como control de carga se utilizó el gen de la actina de olivo. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de la condición control, no inoculadas ( $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ ), y los resultados se expresan como  $\log_{10}$  de la expresión relativa. Las barras de error en cada panel y condición indican la desviación estándar en tres replicas técnicas realizadas sobre una mezcla del material biológico procedente de cuatro plantas.

# DISCUSIÓN

---



La VO causada por cepas del patotipo D de *V. dahliae* es la principal enfermedad de suelo que amenaza la producción de olivo en los países de la cuenca mediterránea (Jiménez-Díaz y col., 2012). Debido a las características de su patogénesis, la VO es una enfermedad compleja y su gestión debe basarse en una estrategia de manejo integrado que incluya junto a medidas destinadas a mitigar la severidad y la repercusión del ataque en las plantaciones establecidas, otras de carácter preventivo (Tjamos, 1993; Tjamos y Jiménez-Díaz, 1998; Jiménez Díaz y col., 2003; 2012). Investigaciones recientes en condiciones de campo (Jiménez-Díaz y col., 2009) y condiciones controladas (Mercado-Blanco y col., 2004; Vitullo y col., 2013) indican que el tratamiento de las plantas con ACBs tienen el potencial de contribuir al control de la VO cuando se realiza como complemento de otras acciones preventivas.

Determinadas especies de *Trichoderma* son ACBs contra un amplio espectro de patógenos de plantas (Monte, 2001; Lorito y col., 2010), y también han mostrado potencial frente a *V. dahliae* en olivo (Jiménez-Díaz y col., 2009). El antagonismo de *Trichoderma* spp. se ha relacionado con varios mecanismos de acción, incluyendo la producción de antibióticos y/o enzimas hidrolíticas y la competencia por los nutrientes (Benítez y col., 2004). Además, algunas cepas de *Trichoderma* spp. son capaces de interactuar con la planta induciendo en ella resistencia a estreses bióticos y abióticos, y promoviendo su crecimiento (Shoresh y col., 2010; Hermosa y col., 2012). Sin embargo, existen pocos estudios sobre los mecanismos que subyacen en el antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *V. dahliae*.

Los ensayos de biocontrol realizados en este trabajo con cinco cepas pertenecientes a tres especies de *Trichoderma* muestran que en su actividad antifúngica frente a *V. dahliae* concurren diferentes mecanismos. En cultivo dual, las cepas Bt2, Bt3 y T25 de *T. asperellum* y T11 de *T. atroviride* sobrecrecieron las colonias de cepas D y ND de *V. dahliae* (Tabla 8). Aunque este hecho no se puede asociar necesariamente con micoparasitismo porque no se determinaron actividades enzimáticas en el antagonista, un mayor sobrecrecimiento del patógeno implica mayor antagonismo. Contrariamente, la cepa *T. gamsii* Bt1 no saltó sobre la colonia de ninguna de las ocho cepas del patógeno incluidas en el estudio; incluso algunas de las cepas D y ND de *V. dahliae* inhibieron el crecimiento de esta cepa de *T. gamsii*. Se ha descrito que el micoparasitismo es una característica ancestral en hongos del género *Trichoderma* (Druzhinina y col., 2011), si bien el potencial micoparasítico de *Trichoderma* spp. también depende de las cepas enfrentadas (Hermosa y col., 2000; Atanasova y col., 2013). Aunque estudios previos habían indicado que algunos hongos fitopatógenos del sistema vascular como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* no eran micoparasitados por algunas especies de *Trichoderma*, entre ellas *T. asperellum* (Pérez y col., 2015; Taghdi y col., 2015), las tres cepas de *T. asperellum*, Bt2, Bt3 y T25, del estudio mostraron un alto potencial presumiblemente micoparasítico frente a las ocho cepas de *V. dahliae* ensayadas. A su vez, las cepas *T. asperellum* T25 y *T. atroviride* T11 mostraron similar potencial antagonista frente a las ocho cepas de *V. dahliae* en cultivo dual. En este

sentido, *T. atroviride* es una de las especies más citadas en biocontrol (Hermosa y col., 2000, 2004; Woo y col., 2014).

De los resultados obtenidos en los ensayos con membrana se deduce que la antibiosis es otro de los mecanismos de biocontrol que despliegan las especies de *Trichoderma* frente a *V. dahliae*. El crecimiento del patógeno fue inhibido por compuestos difusibles producidos por *Trichoderma* spp. en ausencia de *V. dahliae* (Tablas 9 y 10). Los mayores valores de inhibición obtenidos para la cepa *T. atroviride* T11 frente a las cinco cepas de *V. dahliae* incluidas en los ensayos utilizando dos tipos de membrana distintos, en comparación con los obtenidos para las tres cepas de *T. asperellum*, Bt2, Bt3 y T25, se pueden asociar con una mejor actividad antifúngica de *T. atroviride* frente a *V. dahliae*. A su vez, los similares porcentajes de inhibición de las cepas de *V. dahliae* observadas para las cepas de *Trichoderma* spp. en los ensayos realizados con membrana de diálisis con tamaño de poro de 14 kDa y con membrana de celofán, indican que este patógeno es muy sensible a pequeños compuestos secretados por el antagonista. Este hecho está de acuerdo con un estudio previo que señalaba a los pequeños metabolitos como los mayores contribuyentes a la actividad antifúngica de cepas de *T. asperellum* frente a los patógenos *R. solani*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* (Taghdi y col., 2015). Es sabido que los metabolitos de *Trichoderma* spp. juegan un importante papel en el micoparasitismo del hongo ya que al actuar sinérgicamente con enzimas hidrolíticas de la pared celular fúngica facilitan la rotura de las estructuras del patógeno (Schirmböck y col., 1994). Por tanto, el biocontrol de *Trichoderma* se basaría principalmente en la producción de enzimas hidrolíticas y/o metabolitos (Harman y col., 2004; Lorito y col., 2010). Los ensayos de membrana realizados en el presente estudio no permitieron valorar la existencia de sinergias entre el micoparasitismo y la antibiosis en las cepas de *Trichoderma* ya que cabría esperar que pocas hidrolasas estuvieran presentes en el medio de cultivo donde se inoculó el patógeno. En este sentido, la mayoría de los genes que codifican este tipo de enzimas se inducen por situaciones asociadas a micoparasitismo (Ej., paredes del patógeno, déficit de nitrógeno) (Lorito y col., 1993; Geremía y col., 1993; de la Cruz y col., 1995a; Limón y col., 1999; Sanz y col., 2004; Suárez y col., 2004; Montero y col., 2007; Gruber y Seidl-Seiboth, 2012), y los ensayos de membrana se realizaron en un medio nutritivamente rico como es el PDA y el micelio de *Trichoderma* se retiró de la placa antes de inocular el patógeno, por lo que ambos hongos nunca llegaron a establecer contacto.

Tanto las observaciones realizadas como las medidas tomadas en los ensayos realizados en cultivo dual con las cepas *T. atroviride* T11 y *V. dahliae* V-138I enfrentadas en un medio discontinuo sugieren que la primera puede inhibir el crecimiento de *V. dahliae* mediante VOCs. *Verticillium dahliae* D V-138I se aisló de algodón en Córdoba y pertenece al linaje 1A/D, cuyas cepas son altamente virulentas y causan defoliación en algodón, okra y olivo. Un estudio reciente, basado en análisis genealógicos y filogenéticos, ha mostrado la existencia de cinco subgrupos dentro del linaje 1A/D de *V. dahliae* que, a su vez, correlacionan bien con los orígenes geográficos

de este patógeno en la cuenca del Mediterráneo (Milgroom y col., 2016). Este hecho está de acuerdo con la hipótesis de que el patotipo D se introdujo en esta zona en, al menos, cinco eventos independientes, a partir de una población de origen relativamente diversa. Y también es consistente con la hipótesis de una rápida expansión de su población en la fuente de origen durante la emergencia de 1A/D como un patógeno severo de algodón en EE.UU. (Collado-Romero y col., 2006; Jiménez-Gasco y col., 2014; Milgroom y col., 2014).

Los compuestos producidos por *V. dahliae* y *Trichoderma* spp. en ausencia de contacto físico entre sus colonias redujeron recíprocamente su crecimiento. Sin embargo, según nuestras observaciones en los enfrentamientos de las cepas V-138I y T11 en medio discontinuo, el efecto antifúngico de los VOCs de *T. atroviride* T11 es superior al de los VOCs de *V. dahliae* D V-138I. En la literatura micológica existen referenciados más de 250 VOCs producidos por hongos (Morath y col., 2012), muchos de los cuales tienen olores característicos y se producen durante el metabolismo primario y secundario, y estos compuestos pueden ser responsables del éxito en biocontrol de algunas especies de *Trichoderma* (Morath y col., 2012). En este sentido, el olor a coco de algunas especies de *Trichoderma* se ha asociado con la producción de 6-PP, un metabolito con demostradas propiedades antifúngicas (Reino y col., 2008; Rubio y col., 2009) y que ha sido previamente identificado en cultivos de *T. atroviride* T11 (Keszker y col., 2000).

Teniendo presente los resultados obtenidos en todos los ensayos de antagonismo *in vitro* realizados, se seleccionaron las cepas Bt3 y T25 de *T. asperellum* y T11 de *T. atroviride* para estudiar su capacidad para suprimir la VO causada por el patotipo D de *V. dahliae*. Aunque no es posible extrapolar la actividad de biocontrol que presenta una cepa bajo condiciones de laboratorio a un ambiente natural, los resultados de antagonismo *in vitro* han servido para seleccionar potenciales ACB frente a un patógeno determinado en otros estudios (Hermosa y col., 2000; Taghdi y col., 2015).

Para la realización de los ensayos *in vivo* se seleccionaron: la variedad de olivo Picual, la más cultivada tanto en España como a nivel mundial y que es altamente susceptible al patotipo D de *V. dahliae*; una cepa del patógeno altamente virulenta y que pertenece al patotipo D causante de las mayores pérdidas en producción, el V-138I (Jiménez-Díaz y col., 2009, 2012; Barranco, 2010); y un ambiente altamente favorable para el desarrollo de VO severa en plantas no tratadas (Calderón y col., 2014; Jiménez-Fernández y col., 2016; Palomares-Rius y col., 2016). A pesar de todo ello, los resultados de los ensayos presentados en la Tabla 12 muestran que una colonización previa de la raíz por alguna de estas tres cepas de *Trichoderma* spp. tiene potencial para suprimir significativamente el desarrollo de la Verticilosis en olivo. Aunque el tratamiento con los antagonistas no redujo la incidencia de la enfermedad, sí redujo la cantidad total desarrollada de ella (área bajo la curva de progreso de enfermedad). Asimismo, el tratamiento con las cepas Bt3 y T25 dio lugar a un retraso en la aparición

de los síntomas y a una reducción en la severidad de los mismos. En estos ensayos, las dos cepas de *T. asperellum* presentaron mejor capacidad para reducir la VO comparado con la cepa *T. atroviride* T11. Estos resultados amplían el conocimiento del comportamiento de *Trichoderma* spp. frente a *V. dahliae* en olivo bajo condiciones altamente favorables para la Verticilosis alcanzado en un estudio previo, donde se contrastó el potencial de una formulación de *Trichoderma* spp. que contiene *T. gamsii* Bt1 y *T. asperellum* Bt2 contra la VO en ensayos en cámara de crecimiento y en pequeñas parcelas de campo infestadas artificialmente (Jiménez-Díaz y col., 2009).

Se considera que la colonización extensa del sistema radical de la planta es uno de los prerequisites para el desarrollo con éxito de los efectos beneficiosos de *Trichoderma* spp. en las plantas (Harman et al., 2004; Morán-Díez et al., 2009; Rubio et al., 2014). En los ensayos realizados en esta tesis, la cepa T25 de *T. asperellum* mostró mejor capacidad para colonizar la rizosfera de olivo “Picual” que las cepas Bt3 de *T. asperellum* y T11 de *T. atroviride* (Tabla 11), y junto con la cepa T11 fueron capaces de infectar endofíticamente la raíz de la planta. Los datos indicaron que el método de aplicación de *Trichoderma* spp. afectó a su capacidad para colonizar la rizosfera del olivo, cuya extensión se vio incrementada si el antagonista se aplicaba mediante una infestación del suelo en vez de mediante riego con una suspensión de conidias.

Se conoce la capacidad de *Trichoderma* spp. para promover respuestas de crecimiento en la planta (Hermosa y col., 2012). Este efecto positivo se ha relacionado con su capacidad para solubilizar nutrientes y para producir fitohormonas tales como el IAA (Altomare y col., 1999; Contreras-Cornejo et al., 2009). Los VOCs de los hongos tienen también un papel importante en la señalización en la naturaleza y muchas interacciones ecológicas están mediadas por estos compuestos, incluidas aquellas entre hongos y plantas, artrópodos, bacterias y otros hongos (Morath y col., 2012; Battaglia y col., 2013; Hermosa y col., 2014). Por ejemplo, la 6-PP a dosis bajas promueve el crecimiento de las plantas (Vinale y col., 2009), ya que regula la morfogénesis de la raíz mediante la señalización de auxinas y la modificación de la ruta del ET, a través del factor EIN2 (Garnica-Vergara y col., 2016).

En la Tabla 13 se muestra que solo la cepa T25 de *T. asperellum* indujo una significativa promoción del crecimiento en las plantas de olivo “Picual”, independientemente del método usado para su aplicación. Este efecto podría ser debido a su mayor capacidad para colonizar la rizosfera del olivo, la cual fue de 2,5 a 3,5 veces mayor que la de la cepa *T. asperellum* Bt3 a las 2 semanas de su aplicación y que, a su vez, dependió del método empleado para su inoculación. En este sentido, aunque la población rizosférica de las cepas Bt3 y T25 de *T. asperellum* y T11 de *T. atroviride* en olivo disminuyó a las 12 semanas cuando el antagonista se aplicó mediante infestación del suelo de la maceta (Tabla 11), la densidad de población para la cepa T25 fue superior a las otras dos cepas. Sin embargo, la población rizosférica de la cepa T25 se redujo a menos de un 30%, su densidad fue inferior a la de la cepa T11 y similar a la de

Bt3, si se aplicó mediante riego con conidias, mientras que la de Bt3 permaneció casi estable durante las 12 semanas de duración del ensayo. Estos resultados sugieren que el sustrato empleado jugó un papel importante en el establecimiento del antagonista y, por ende, en su efecto sobre el crecimiento de la planta. Es sabido que las respuestas de crecimiento se ven afectadas tanto por la cepa de *Trichoderma* spp. (Rubio y col., 2012, 2014) como por la estructura genética de la planta (Tucci y col., 2011), habiéndose observado tanto efectos positivos como negativos tras la aplicación de distintas *Trichoderma* spp. en diferentes genotipos de tomate.

Es de destacar que las cepas T11 de *T. atroviride* y T25 de *T. asperellum* indujeron promoción del crecimiento incluso en plantas de olivo bajo condiciones de Verticilosis severa. Bajo presión de enfermedad cabría esperar una activación de defensas y una supresión del crecimiento en la planta pues mantener activados ambos procesos sería energéticamente muy costoso (Hermosa y col., 2012; Kazan y Manners, 2012). Los resultados presentados en las Tablas 12 y 13, donde se observa la supresión de enfermedad por las cepas de *Trichoderma* spp. bajo alta presión de Verticilosis, junto a una promoción del crecimiento del olivo, al menos, con las cepas T11 y T25, sugieren que ambas ejercen actividad antagonista contra *V. dahliae* V-138I y las plantas podían invertir su energía en crecimiento. Por tanto, este incremento de crecimiento en las plantas era un indicador de supresión de enfermedad en las mismas. El potencial de biocontrol de la VO observado *in vivo* para estas cepas estaría de acuerdo con el elevado potencial antagonista que habían mostrado en los ensayos *in vitro*. Los resultados de los ensayos *in vivo* apoyan la hipótesis de que las cepas Bt3 y T25 de *T. asperellum* pueden establecerse exitosamente en la rizosfera del olivo y que ejercen biocontrol frente a la VO en patosistemas bajo condiciones de enfermedad severa. Esto las convertiría en herramientas adecuadas para el manejo de la enfermedad, aunque su mérito debe valorarse también en plantaciones de olivo bajo condiciones naturales.

Aunque el micoparasitismo es una propiedad ancestral en el género *Trichoderma* spp., especies como *T. atroviride* y *T. virens* exhiben capacidades micoparasíticas más altas (Kubicek y col., 2011; Druzhinina y col., 2011). Entonces, el potencial de biocontrol de la cepa *T. atroviride* T11 frente a V-138I observado en los diferentes ensayos se podría explicar más en términos de una disponibilidad de genes que de su regulación, la cual puede estar influenciada por la naturaleza del patógeno al que se enfrenta (Druzhinina y col., 2011).

Los ‘microarrays’ HDO de *Trichoderma* spp. ya han demostrado su utilidad para analizar cambios transcriptómicos en este hongo, pues se utilizaron en estudios de *T. harzianum* crecido bajo condiciones de micoparasitismo simulado (Samolski y col., 2009) y de otras *Trichoderma* spp. en interacción con plantas (Rubio y col., 2012, 2014). En esta tesis doctoral se empleó un ‘microarray’ HDO de *Trichoderma* spp. para analizar los cambios relativos al micoparasitismo que pueda ocurrir cuando T11 sobrecrece a V-138I. Ya que *V. dahliae* es una diana poco habitual en este tipo de

estudios, los resultados aquí obtenidos permitirán aumentar el conocimiento a nivel molecular del micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre este patógeno. Con fines comparativos, para el crecimiento de los hongos se utilizó un diseño experimental similar al empleado en estudios previos llevados a cabo para identificar genes de micoparasitismo en *T. atroviride* IMI 206040 tras contactar con *R. solani*, mediante secuenciación 454 (Reithner y col., 2011), y para estudiar las estrategias de micoparasitismo de *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei*, mediante ‘microarrays’ (Atanasova y col., 2013). Mientras que en otros estudios transcriptómicos se había simulado el micoparasitismo, se creció a *Trichoderma* spp. en un medio líquido con paredes celulares de patógenos como *B. cinerea* (Samolski y col., 2009) o *S. sclerotiorum* (Steindorff y col., 2014).

El ‘microarray’ HDO se construyó sobre los genomas de *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei*, los que estaban disponibles en el año 2012; por tanto, dicho ‘microarray’ contenía sondas de las tres especies de *Trichoderma*. Ya que un 98,6% de los genes identificados como expresados diferencialmente en, al menos, dos de las tres condiciones testadas (NV, micelio de T11 a 0,5 cm de distancia de la colonia de V-138I; OV, micelio de la zona de sobrecrecimiento en el enfrentamiento de T11 y V-138I; y CON, micelio de T11 creciendo solo, utilizado como control) pertenecía al genoma de *T. atroviride*, el ‘microarray’ HDO de *Trichoderma* spp. utilizado demostraba ser una herramienta eficaz, en contraposición con la objeción de algunos autores respecto a su uso por una tendencia a detectar falsos positivos debido a hibridaciones cruzadas (Reithner y col., 2011). Además, los perfiles de expresión observados para los 16 genes analizados por qPCR confirmaron los resultados obtenidos del análisis de ‘microarray’ (Fig. 15). En consecuencia, el conjunto formado por los 143 genes expresados diferencialmente entre OV y NV y también entre OV y CON (Fig. 14 y Tabla 14) se podía asociar inequívocamente con el micoparasitismo de la cepa T11 sobre la cepa V-138I. Entre ellos, las categorías GO sobrerrepresentadas también estaban de acuerdo con una estrategia de micoparasitismo. Ya que el crecimiento de la hifa parásita a expensas del huésped requiere la síntesis de nuevos materiales de pared celular y de membrana, el aumento observado en el metabolismo (proteólisis) y en las actividades catalítica (oxidoreductasa, hidrolasas y ligasa) y de toma de nutrientes (transporte) sería el esperado para la situación descrita.

Cuando se refinó manualmente la anotación funcional automática para esos 143 genes de *T. atroviride* T11 (Tabla 15), se identificaron una gran diversidad de funciones para las que se puede deducir un papel en micoparasitismo. La sobrerregulación en la cepa T11 de 21 genes que codifican CAZymes, pertenecientes a todas sus clases, y de 10 genes que codifican proteasas (serina, aspártica y metaloproteasas) en la condición OV es compatible con un proceso de micoparasitismo encaminado a debilitar e hidrolizar la pared celular de *V. dahliae* D V-138I y acceder más fácilmente a sus nutrientes. Recientemente se ha descrito que en el micoparasitismo de *T. harzianum* sobre *S. sclerotiorum* ocurre un incremento en la expresión de genes de CAZymes

(Steindorff y col., 2014). Sin embargo, previamente se había observado una infrarregulación de genes de glicosil hidrolasas durante el micoparasitismo de *T. atroviride* IMI 206040 sobre *R. solani* (Atanasova y col., 2013). Y también, que en enfrentamientos de esta cepa de *Trichoderma* consigo misma, cambiaba la expresión de un 52,8% de sus genes, mientras que este porcentaje se reducía a un 45% en los enfrentamientos con ese patógeno. Los genes infrarregulados en la cepa de *T. atroviride* diferenciales entre las confrontaciones con *R. solani* y con ella misma se asignaron a las categorías de biosíntesis de SMs, transporte y catabolismo (Reithner y col., 2011). En el trabajo realizado en esta tesis, cuando se incluyó con fines comparativos la condición NT, la cepa T11 enfrentada consigo misma, se observó para tres de los 10 genes ensayados mediante qPCR, que representaban al lote de los 143 genes diferenciales en la condición OV según el análisis de ‘microarray’, una sobrerregulación en la condición NT también, pero el nivel de expresión de los 10 genes fue siempre superior en la condición OV. Algunos estudios han concluido que las especies de *Trichoderma* son capaces de “percibir” la proximidad del otro hongo antes del contacto físico (Seidl y col., 2009; Atanasova y col., 2013). Los perfiles de expresión de genes de T11 presentados en las Figs. 16 y 17 confirman que los niveles de expresión de algunos genes se vieron afectados, con distinto nivel de intensidad, por la proximidad de la colonia de un hongo susceptible o no de ser parasitado.

También se observó la infrarregulación del gen de una  $\alpha$ -xilanasa en la condición OV. Ya que los promotores de algunas peptidasas tienen motivos comunes con los de xilanasas (Steyaer y col., 2004; Suárez y col., 2007), esa infrarregulación evitaría una competición con las peptidasas requeridas en el proceso micoparasítico. En el presente estudio y como se ha indicado antes, la proteólisis fue un proceso biológico sobrerrepresentado en la condición OV, resultado que está de acuerdo con la significativa mayor actividad proteasa detectada en la condición OV respecto a las obtenidas en NV y CON. Estudios previos han indicado también el papel fundamental de las peptidasas en el micoparasitismo de *Trichoderma* spp. (Seidl y col., 2009; Atanasova y col., 2013; Steindorff y col., 2014), y que las serin- y aspartil- peptidasas se inducen fuertemente con paredes desactivadas de hongos y con quitina (Steyaer y col., 2004).

Junto a la sobrerregulación de genes de peptidasas y de CAZymes, se observó una notable actividad de transporte en la condición OV, la cual era debida a la sobrerregulación de una gran diversidad de genes de transporte, siendo los miembros de la familia MFS los más abundantes. Este hecho está de acuerdo con las observaciones más recientes (Steindorff y col., 2014); sin embargo, una infrarregulación de transportadores MFS se había asociado con el micoparasitismo de *T. atroviride* IMI 206040 sobre *R. solani* en trabajos previos (Seidl y col., 2009; Atanasova y col., 2013).

También cabía esperar la sobrerregulación de genes de SCCPs observada en la condición OV, ya que existe una expansión de estas proteínas en el genoma de *T.*

*atroviride* (Kubicek y col., 2011) y, a su vez, ellas se han asociado con el micoparasitismo de *Trichoderma* spp. frente a hongos fitopatógenos (Omann y col., 2012; Atanasova y col., 2013; Steindorff y col., 2014). Sin embargo, en la condición de OV no se expresaron diferencialmente ni genes implicados en la adherencia de *Trichoderma* a la hifa del huésped como son los de hidrofobinas y los de estructura tipo papila, ni tampoco genes de transportadores tipo ABC implicados previamente en procesos de detoxificación (Druzhinina y col., 2011), aunque sí que estuvieron sobrerregulados en la condición OV varios genes de proteínas implicadas en defensa y respuestas de detoxificación.

Como ya se ha indicado, los SMs juegan un papel fundamental en el micoparasitismo de *Trichoderma* spp. (Schrimböck y col., 1994; Lorito y col., 2010; Hermosa y col., 2014). El metabolismo secundario de la cepa T11 de *T. atroviride* se incrementó durante su micoparasitismo sobre V-138I. A tenor de la elevada actividad antifúngica de compuestos secretados por T11 frente a V-138I observada en ensayos de membrana, en ausencia de contacto entre ambos hongos, los genes de SMs sobrerregulados en la condición de OV deberían codificar metabolitos de tipo diferente.

Una característica común y destacable de los genomas de *T. atroviride* y *T. virens*, a la que aún no se ha dado una explicación, es el gran número de genes de síntesis de PKSs y NRPSs que contienen. En el análisis de ‘microarrays’, entre los 21 genes de metabolismo secundario sobrerregulados en la condición de OV, solo aparecieron dos genes de PKs (ID211357 y ID32458) y uno de NRPSs (ID156569) de las 18 y 16 anotadas, respectivamente, en el genoma de *T. atroviride* (Kubicek y col., 2011; Mukherjee y col., 2012). También se ha descrito que durante el micoparasitismo de *T. atroviride* y *T. virens* frente a *R. solani* ocurre una sobrerregulación de genes de proteínas de unión (Atanasova y col., 2013). Sin embargo, otros estudios han publicado una infrarregulación de genes que codifican proteína de esa categoría cuando *T. harzianum* crece en presencia de paredes celulares desactivadas de *S. sclerotiorum* o *Fusarium solani* (Vieira y col., 2013; Steindorff y col., 2014).

Dos genes de preniltransferasas fueron sobrerregulados en la condición de OV, y este hecho es compatible con un incremento en el metabolismo de terpenos. Los terpenos de hongos derivan de la unión de unidades de isopentenildifosfato, y las preniltransferasas catalizan la ciclación de estas unidades para producir los mono-, sequi- y diterpenos que tienen diferente potencial antibiótico, y también los triterpenos, de los cuales el ergosterol es el principal componente de la membrana de los hongos (Liang y col., 2002; Malmierca y col., 2015c).

Es de destacar la sobrerregulación de tres genes que codifican proteínas del tipo isoflavona reductasa (IFRs) con dominios NmrA que ocurría en la cepa *T. atroviride* T11 al sobrecrecer a V-138I. Las IFRs son enzimas del metabolismo secundario implicadas en la producción de isoflavonas. En plantas, se ha descrito que fitoalexinas

de tipo isoflovona son factores clave de los cambios que acontecen en el microbioma de la rizosfera, ya que pueden atraer tanto a simbioses como a patógenos. Estos compuestos estimulaban la germinación de conidias y la ramificación de las hifas de micorrizas, e influían en el ‘quorum sensing’ (Philippot y col., 2013). Genes que codifican IFRs fueron sobrerregulados en *T. atroviride* al contactar con *R. solani* (Kubicek y col., 2011; Reithner y col., 2011), y también en *T. parareesei* en respuesta a la presencia de plantas de tomate (Rubio y col., 2014). En estos últimos estudios se relacionaron los genes de IFRs con procesos de metabolismo secundario. Sin embargo, los IFRs con dominios NmrA constituyen un subgrupo particular dentro de la familia de IFRs, y existe una expansión de estos genes en el genoma de *T. atroviride* (Kubicek y col., 2011). La proteína NmrA es un regulador negativo implicado en la modificación postraduccional del factor de transcripción de tipo GATA AreA, y éste es un regulador positivo que forma parte de un sistema de control general del metabolismo de nitrógeno, denominado represión por metabolito, en varios hongos (Stammers y col., 2001). En consecuencia, la sobrerregulación de genes que codifican reguladores negativos del tipo IFR-NmrA observada en el proceso de micoparasitismo de T11 sobre V-138I, la condición de OV, indicaría una inactivación en el hongo de las rutas destinadas a utilizar fuentes de nitrógeno no preferentes debido a que tendría a su disposición fuentes de nitrógeno más sencillas.

En este estudio, *T. atroviride* T11 mostró excelentes capacidades de biocontrol frente a la cepa *V. dahliae* D V-138I. La cepa T11 tiene capacidad para matar a este patógeno mediante micoparasitismo, inhibir su crecimiento a través de VOCs y otros compuestos difusibles producidos antes del contacto, e incluso suprimir significativamente el desarrollo de la Verticilosis en plantas de olivo, bajo condiciones favorables para enfermedad severa causada por la cepa V-138I. Y, el análisis de ‘microarrays’ indica que la proteólisis es el principal proceso biológico implicado en el micoparasitismo de T11 frente a V-138I.

La utilización de genotipos de acebuche altamente resistentes a *V. dahliae* D como portainjertos de variedades de olivo agrónomicamente adaptadas y comercialmente deseables podría ser uno de los mejores medios para el manejo integrado de la VO (Jiménez-Díaz y col., 2012; Arias-Calderón y col., 2015; Jiménez-Fernández y col., 2016).

Para conocer la dinámica de colonización de la cepa *V. dahliae* D V-138I en plantas con distinta susceptibilidad al patógeno y, a su vez, el papel que pudiera desempeñar *Trichoderma* spp. en el proceso, se utilizaron para estudios mediante microscopía confocal láser: plantones de olivo “Picual” y de tres clones de acebuche con distinta resistencia al patógeno, Ac-4, Ac-15 y Ac-18, y cepas de ambos hongos marcadas con distinta fluorescencia. La variedad de olivo Picual está descrita como altamente susceptible a *V. dahliae* D (López-Escudero y col., 2004; Mercado-Blanco y col., 2004) y en los clones de acebuche Ac-4 y Ac-18, caracterizados como altamente

resistentes al patotipo D de *V. dahliae* (Jiménez-Díaz y col., 2013), se ha observado un menor crecimiento y colonización vascular del patógeno durante la fase sistémica de la patogénesis (Jiménez-Fernández y col., 2016) y el mantenimiento de su resistencia a *V. dahliae* en coinfecciones por *Meloidogyne javanica* (Palomares-Rius y col., 2016).

Se obtuvieron transformantes de *V. dahliae* D V-138I que expresan un gen que codifica una proteína con fluorescencia amarilla; y transformantes de las cepas *T. atroviride* T11 y *T. asperellum* T25, marcadas con proteínas de fluorescencia verde. No se incluyó ninguno de los transformantes de *Trichoderma* obtenidos durante la tesis en los estudios de microscopía confocal, porque los transformantes de la cepa T11 no mostraron estabilidad genética durante el proceso de selección mediante una alternación de crecimiento en medios selectivo y no selectivo, y los de la cepa T25, a pesar de mostrar estabilidad genética, y fenotipo y capacidades antagonistas similares a las observadas en la cepa silvestre, las hifas procedentes de cultivos líquidos presentaban niveles de fluorescencia bajos en comparación con los observados en las del transformante *T. harzianum* GFP22 que se usó como referencia.

Desde el descubrimiento de la GFP y su utilidad como marcador en los estudios de interacción planta-patógeno (Shimomura y col., 1962), numerosos estudios han demostrado la utilidad de la microscopía confocal para entender mejor el desarrollo espacio-temporal de los procesos de infección y colonización de patógenos en distintas variedades de plantas herbáceas, incluyendo interacciones compatibles e incompatibles (Eynck y col., 2007; Jiménez-Fernández y col., 2013; Niño-Sánchez y col., 2015). Sin embargo, los estudios de microscopía confocal realizados sobre plantas leñosas como el olivo son más escasos (Prieto y Mercado-Blanco, 2008; Prieto y col., 2009; Pantelides y col., 2009; Ruano-Rosa y col., 2016).

La utilidad del transformante GFP22 en estudios de microscopía confocal se ha demostrado previamente, ya que permitió demostrar que *T. harzianum* accede y coloniza los haces vasculares de raíz en mutantes de *A. thaliana* bloqueados en la ruta del SA (Alonso-Ramírez y col., 2014), modifica la arquitectura de la raíz de pepino e incrementa el número de pelos de raíces secundarias (Samolski y col., 2012), y coloniza profusamente el rizoplasma de raíces de olivo “Picual” en presencia y ausencia de una cepa de *V. dahliae* (Ruano-Rosa y col., 2016).

Los transformantes de *V. dahliae* D V-138I obtenidos, vía *A. tumefaciens*, expresaron de forma estable la eYFP pero mostraron diferencias en la intensidad de fluorescencia, posiblemente por diferencias en los sitios de integración del casete de transformación en el genoma de *V. dahliae*. Este sistema de transformación ya ha demostrado ser de utilidad en la obtención de transformantes de *V. dahliae* (Eynck y col., 2007; Prieto y col., 2009). Se seleccionó el transformante V138-Yh por mostrar una intensidad de fluorescencia más alta que el resto, además de por ser indistinguible de la cepa silvestre de la que se originó en lo concerniente a la morfología de sus

colonias, los radios de crecimiento y su comportamiento en cultivo dual con las cepas Bt2, Bt3, T11 y T25, donde fue sobrecrecido por estas cepas de *Trichoderma* spp. en igual medida que lo era V-138I. A su vez, la defoliación observada en plántones de olivo “Picual” y en el clon de acebuché Ac-15 tras ser inoculados con V138-Yh demostraba su virulencia en ambos genotipos de planta.

Se observó que *V. dahliae* se aproxima a la raíz, con independencia de la resistencia de la planta, y que utiliza los pelos radicales para acceder al córtex, creciendo por espacios intercelulares hasta alcanzar los vasos del xilema. Ya que el hongo penetró la raíz de olivo “Picual” y de los clones de acebuché Ac-4, Ac-15 y Ac-18, se observaron sus hifas en tejidos internos, y no se detectó una producción masiva de conidias y microesclerocios en la epidermis de este órgano en ninguno de los cuatro genotipos, todo el material vegetal era un huésped adecuado de *V. dahliae* V-138I. Sin embargo, el nivel de fluorescencia observado en cortes de raíz siempre fue mayor en “Picual” y “Ac-15” que en “Ac-4” y “Ac-18”. De hecho, el patógeno V138-Yh se observó en los haces vasculares de la raíz de “Picual” y “Ac-15” a los 11 días de su inoculación (-dip), pero a los 15-dip solo se localizó en córtex y epidermis de “Ac-4” y “Ac-18” y, en este último clon no había accedido aún a los vasos a los 28-dip. El patógeno alcanzó el tejido vascular del tallo en todos los casos pero, al igual que ocurría en raíz, la colonización de “Picual” y “Ac-15” se inició antes y fue mucho más extensa que en “Ac-4” y “Ac-18”. Los niveles de fluorescencia observados en secciones de tallo de los cuatro tipos de plántones inoculados con *V. dahliae* D V138-Yh mostraron elevada correlación positiva con los datos de reaislamiento del patógeno en muestras de tallo bajo, medio y alto. Los recuentos obtenidos de las tres zonas de tallo y hojas muestreados indican que el olivo “Picual” es el huésped más susceptible al patógeno seguido de “Ac-15”. A pesar de que el patógeno no se reaisló de muestras de tallo alto, medio y bajo de “Ac-18”, si se pudo observar por microscopía confocal en el tallo. Este hecho muestra la alta sensibilidad que tiene dicha técnica cuando se dispone de buenas herramientas, es decir, cepas con una fluorescencia elevada. Estas observaciones están de acuerdo con las publicadas recientemente donde se cuantificó mediante qPCR una cantidad mucho menor del patógeno en clones de acebuché con alta resistencia a *V. dahliae* V-138I comparado con la elevada cantidad de éste cuantificada en plantas de “Picual” susceptibles, y también se detectó el patógeno en tallo de “Ac-18” a pesar de no reaislarse en un muestreo de este órgano (Jiménez-Fernández y col., 2016).

Aunque la clorosis de las hojas no es uno de los síntomas asociados al síndrome defoliante causado por cepas del patotipo D de *V. dahliae* en olivo (Jiménez-Díaz y col., 2012), los valores de clorofila obtenidos en los clones Ac-4 y Ac-15 inoculados con *V. dahliae* D V138-Yh mostraron que el patógeno ocasiona una disminución significativa de los niveles de clorofila en hojas de la parte superior del tallo en ambos clones. En este sentido, también se ha descrito que la cantidad de clorofila total puede ser un marcador sensible de la adaptación de la planta (Sun y col., 2014).

Se ha publicado que *Trichoderma* spp. se beneficia de los exudados de la raíz de las plantas y que las condiciones existentes en esos nichos favorecen el proceso de colonización por el hongo (Woo y Lorito, 2006; Rubio y col., 2012). Las observaciones realizadas en los plantones inoculados con *T. harzianum* GFP22 indicaron que la colonización de la raíz por este transformante no se vio afectada por el genotipo de la planta y, en todos los casos, ésta se limitó a los espacios intercelulares; además, el hongo nunca se reaisló de tallo y hoja. Esto último es coherente con los resultados de trabajos previos en los que *Trichoderma* spp. colonizó la raíz de diferentes plantas sin alcanzar nunca los vasos del xilema (Yedidia y col., 1999; Chacón y col., 2007; Samolski y col., 2012). Por otro lado, la persistencia de *T. harzianum* GFP22 a lo largo del tiempo se demostró con su presencia en las muestras de raíz tomadas a los 62 días de su inoculación, y también indicaría que *T. harzianum* es un buen colonizador endofítico de raíz de olivo y de acebuche. Ya se conoce que las especies de *Trichoderma* tienen como hábitat tejidos de las plantas, incluso que algunas, entre ellas cepas de *T. harzianum*, pueden penetrar a través de los tricomas del tallo y mantenerse como endófitas sin causar daños aparentes en plantas como el cacao (Bailey y col., 2006, 2008; Bae y col., 2009). Sin embargo, recientemente se había publicado la imposibilidad de *T. harzianum* GFP22 para mantenerse metabólicamente activa en raíces de “Picual” (Ruano-Rosa y col., 2016). Estos autores observaron fundamentalmente una biomasa de clamidosporas de GFP22 en la superficie de la raíz de “Picual” y que la cepa no accedió a capas más internas de este órgano. Las imágenes de cortes longitudinales y transversales de raíz de los plantones de olivo y de acebuche inoculados con *T. harzianum* GFP22 o conjuntamente con *T. harzianum* GFP22 y *V. dahliae* D V138-Yh, tomadas en el estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral, muestran a las hifas de *T. harzianum* en la zona adyacente a los haces vasculares de la raíz de las plantas.

Contrariamente a lo observado para *V. dahliae* D V138-Yh, *T. harzianum* GFP22 no indujo cambios en los niveles de clorofila en hoja de las zonas baja, media y alta de plantas de “Ac-4” y “Ac-15”, pero la tendencia de los datos en las hojas de las zonas media y alta indicó que ejerció una influencia sobre los cambios en dichos niveles inducidos por el patógeno, ya que la reducción en los niveles de clorofila fue menor cuando las plantas se co-inocularon con el antagonista y el patógeno comparado con la asociada a la inoculación con este último solamente. Además, los cambios inducidos por antagonista y patógeno estuvieron influidos por el genotipo de la planta ya que solo se observaron diferencias significativas entre los asociados a las infecciones por *V. dahliae* D V138-Yh y *T. harzianum* GFP22 en el clon Ac-4.

La menor intensidad de fluorescencia amarilla observada en muestras de raíz y tallo de plantas de “Picual”, “Ac-15”, “Ac-4” y “Ac-18” infectadas conjuntamente con *T. harzianum* GFP22 y *V. dahliae* D V138-Yh en comparación con la detectada en muestras de una zona similar de la planta en las plantas control no inoculadas, junto con el mayor tiempo necesario desde la inoculación para poder visualizar el micelio del

patógeno en las plantas co-inoculadas comparado con el necesitado para el mismo fin en las plantas inoculadas solo con el antagonista, están en consonancia con un efecto de la infección primera por *T. harzianum* de reducir la extensión de la colonización por el patógeno. La colonización de la raíz de plantas de “Picual”, “Ac-15”, “Ac-4” y “Ac-18” por *T. harzianum* GFP22 retrasó el acceso del patógeno a los haces xilemáticos de estas plantas, y a su vez, este proceso estuvo influenciado por el genotipo de la misma, ya que la cepa GFP22 retrasó aproximadamente 4 y 9 días el acceso de V138-Yh a los haces xilemáticos de la raíz de “Picual” y “Ac-15”, respectivamente. Por el contrario, en los clones Ac-4 y Ac-18 no fue posible cuantificar el retraso que ocasionaba *T. harzianum*, ya que el patógeno no había accedido a los vasos xilemáticos de la raíz a los 20-dip en las plantas co-inoculadas con *T. harzianum* GFP22 y *V. dahliae* D V138-Yh pero tampoco se había observado en este tejido en muestras tomadas a los 15 y 28 días de la inoculación de “Ac-4” y “Ac-18” con el patógeno, respectivamente. Asimismo, la intensidad de señal fluorescente correspondiente al patógeno observada en las muestras de tallo de plantas de “Picual”, “Ac-15”, “Ac-4” y “Ac-18” co-inoculadas con el antagonista y el patógeno fue siempre menor que la correspondiente a muestras de zonas de las plantas inoculadas solo con *V. dahliae* D V138-Yh. A pesar de que el patógeno no se aisló de tejidos de tallo medio y alto de plantas de “Ac-4” y “Ac-18” co-inoculadas y muestreadas a los 42-dip, la fluorescencia correspondiente a V138-Yh se pudo observar mediante microscopía confocal a los 43-dip en muestras de tallo alto de plantas co-inoculadas de “Ac-4” y a los 50-dip en las de “Ac-18”. No obstante, también es cierto, a tenor de la poca fluorescencia amarilla que se observó a esos tiempos de muestreo en los tejidos de tallo alto de estos dos clones de acebuche, que la cantidad de patógeno fue notablemente menor que en las muestras de “Picual” y “Ac-15” a los 43-dip. A su vez, la reducción en los niveles de la fluorescencia del patógeno estuvo correlacionada con una disminución progresiva de la colonización del tallo por el patógeno a lo largo del eje de la planta.

La menor cantidad de patógeno observada por microscopía confocal en muestras de las plantas co-inoculadas de los cuatro genotipos comparada con la correspondiente a las que se inocularon solamente con *V. dahliae* D V138-Yh, junto a la menor defoliación que presentaron los plantones de “Picual” y “Ac-15” co-inoculados en comparación con la que presentaron los inoculadas solamente con el patógeno, sugieren que *T. harzianum* también redujo la severidad de la Verticilosis aún en condiciones altamente favorables para enfermedad severa. Esta capacidad permanece por ser confirmada en ensayos en campo a fin de reafirmar la utilidad de dicho antagonista como ACB con vistas al manejo integrado de la VO.

La señalización de las respuestas a estreses bióticos y abióticos en planta es de gran complejidad, y por tanto, no es una tarea fácil analizar cambios en la expresión de los mecanismos defensivos en plantas como el olivo. Al ser una planta leñosa, los tiempos de ejecución de los ensayos y los destinados a extraer ARN de una calidad aceptable son muy largos. A su vez, utilizar clones de acebuche como Ac-4,

previamente caracterizado por su elevada resistencia al patotipo D de *V. dahliae* (Palomares-Rius y col., 2016), y Ac-15 (un clon muy susceptible al patógeno a tenor de lo observado en los estudios de microscopía confocal), implica disponer de cantidad suficiente de ese material vegetal, lo cual está condicionado por el tiempo necesario para su propagación. No obstante, el principal escollo en el estudio radicó en la falta de herramientas moleculares tanto en olivo como en acebuche, ya que no se dispone de un genoma anotado y se han identificado pocos ortólogos de los genes que se utilizan frecuentemente como marcadores de defensa de las rutas de JA, SA y ET, las tres fitohormonas cuyo papel como señales primarias en la regulación del sistema inmune de la planta está bien establecido (Pieterse y col., 2009; Kazan y Manners, 2012). En dos estudios recientes, la generación de una genoteca substractiva sirvió para identificar genes que se expresaban diferencialmente en raíz y en parte aérea de olivo de la variedad Arbequina (Schilirò y col., 2012; Gómez-Lama Cabanás y col., 2014), susceptible a *V. dahliae*, en respuesta a su colonización por una cepa de *P. fluorescens* con demostrada capacidad endofítica y con potencial frente a la VO (Mercado-Blanco y col., 2004).

En la mayoría de los estudios de señalización de defensa contra la infección por patógenos microbianos se utilizan plantas muy jóvenes, o plántulas crecidas *in vitro* o *in vivo* pero bajo condiciones axénicas presumiblemente carente de comunidades microbianas nativas adicionales. En este estudio se emplearon plantones certificados de acebuche de 4 meses de edad que habían sido propagado en vivero, mediante enraizado de estaquillas semileñosas crecidas en sustratos comerciales, por lo que cabe esperar que los plantones tuvieran una abundante comunidad microbiana nativa; este hecho es representativo de las condiciones del análisis a las que puedan darse en la naturaleza, y aumenta su relevancia desde un punto de vista ecológico.

Al inicio de esta Tesis Doctoral y con objeto de disponer de marcadores con los que llevar a cabo el estudio de mecanismos defensivos en acebuche, se diseñaron oligonucleótidos sobre zonas comunes que se observaban en los alineamientos realizados con secuencias de genes de defensa pertenecientes a diferentes plantas y que estaban disponibles en bases de datos. Sin embargo, para algunas de esas parejas de oligonucleótidos no se obtuvieron las secuencias de los fragmentos amplificados mediante ensayos PCR debido a la baja calidad de los cromatogramas, ello podría estar causado por haber varios moldes en la reacción de secuenciación debido a la existencia de varios productos de PCR de un tamaño similar. Este hecho estaría de acuerdo con una baja homología de secuencia entre los genes de diferentes plantas. En este sentido, para muchos marcadores de defensa descritos en *Arabidopsis* no se han encontrado todavía los ortólogos en el genoma anotado de tomate, una planta donde se vienen realizando numerosos estudios de este tipo (Tucci y col., 2011; Rubio y col., 2014; Pérez y col., 2015). Además, no existe un genoma de olivo disponible a pesar de estar en proceso de anotación desde hace muchos años.

Por otro lado, no se obtuvieron fragmentos de amplificación en ensayos PCR utilizando como molde ADN de los clones Ac-4 y Ac-15 y dos de las nueve parejas de oligonucleótidos descritas para detectar transcritos inducidos por la colonización de *P. fluorescens* PICF7 en olivo “Frantoio” (Schilirò y col., 2012). La ausencia de amplificación podría estar motivada por la falta de expresión de esos dos genes en “Ac-4” y “Ac-15” bajo las condiciones de ensayo empleadas o por un polimorfismo del gen entre las plantas que impediría la hibridación de unos oligonucleótidos diseñados sobre “Frantoio” en unos moldes obtenidos a partir de ARN de los dos clones de acebuche.

Para resolver dichas dificultades, se diseñaron parejas de oligonucleótidos para qPCR sobre las secuencias de siete genes de olivo obtenidas de la base de datos del NCBI y que son ortólogos de genes de defensa de *Arabidopsis*. Mediante la utilización de dichas parejas, se observó una falta de coherencia en los perfiles de expresión de *LOX2* tanto en raíces como en hojas de “Ac-4” y de “Ac-15”. Posteriormente, se observaron dos bandas de amplificación en las muestras de algunas de las condiciones ensayadas en el estudio cuando los productos de la qPCR se visualizaron en geles de agarosa. Por esa razón, los perfiles de expresión de *LOX2* obtenidos en este estudio no se incluyeron en la sección de resultados. Las dos bandas observadas solo en algunas de las condiciones analizadas indican la existencia de, al menos, dos transcritos para el mismo gen, éstos podrían deberse a un procesamiento ('splicing') alternativo, es decir, que durante la edición post-transcripcional del ARN mensajero inmaduro se generasen dos ARN mensajeros maduros. Es conocido que el procesamiento alternativo ha influido en la evolución de las complejas redes de regulación de la expresión génica y su variación ha contribuido a la adaptación de las plantas a su medio ambiente (Syed y col., 2012). Considerando que más de un 21% de los genes de plantas podrían sufrir procesamientos alternativos (Wang y Brendel, 2006), no debería resultar extraño las dos bandas de *LOX2* amplificadas en algunas muestras en nuestro estudio.

Las diferencias existentes en los perfiles de expresión de genes como *PAL*, *WRKY4*, *ACS7*, *IAA9* y *EIN3* en las raíces de “Ac-4” comparados con los de “Ac-15”, asociadas a la inoculación con V-138I, muestran que la defensa local frente a este patógeno es influida por el genotipo de la planta. En este sentido, la sobrerregulación de *PAL* en raíces de “Ac-4” solo se observó a las 24 h de la inoculación con V-138I mientras que en raíz de “Ac-15” se detectó tanto a las 24 como a las 72 h de ella. Ya que una de las vías de biosíntesis del SA en la planta tiene lugar a través de *PAL*, ese incremento en la expresión de *PAL* en las raíces de estos clones de acebuche podría potencialmente estar relacionado con una respuesta de muerte celular local (HR) destinada a limitar el avance del patógeno. Se ha descrito que la defensa de tipo ETI generalmente conlleva una respuesta de tipo HR en el sitio de infección frente a los patógenos con estilo de vida biotrofo y hemibiotrofo (Glazebrook, 2005). Además, la infrarregulación observada paralelamente en hojas de “Ac-4” y “Ac-15”, de plantas inoculadas con V-138I indicaría que no se produjo una respuesta HR sistémica. Los perfiles de expresión de *PAL* observados en raíz de “Ac-4” y “Ac-15” indican que la

infección por V-138I es mayor en este último, pero el nivel de infección se redujo si los plantones habían sido inoculados con *T. harzianum* T34 previamente. A su vez, esto estaría de acuerdo con las observaciones mediante microscopía confocal, que indicaron una mayor susceptibilidad de “Ac-15” al patógeno, pero que la aplicación de T34 disminuía la infección por la cepa D de *V. dahliae*. Como la inoculación de T34 causó sobrerregulación y infrarregulación de *PAL* en raíces de “A-c4” y “Ac-15”, respectivamente, el genotipo de la planta también afectó a la señalización de defensas por *T. harzianum* T34. Se ha demostrado en tomate que los cambios causados por *Trichoderma* spp. en la expresión de algunos marcadores de defensa de las rutas dependientes de JA y SA son influidos por el genotipo de la planta (Tucci y col., 2011), además de por el genotipo del antagonista (Rubio y col., 2012).

Los niveles de expresión de *PR-5* observados en raíz de “A-c4” y “Ac-15” debidos a la inoculación con V-138I y T34 indican que ambos hongos difieren en la señalización de respuestas de defensa en ambos clones de acebuché. Ya que *PR-5*, al igual que otras proteínas PR (Pieterse y col., 2009), es un marcador de respuestas defensivas dependientes de SA (Sels y col., 2008), la sobrerregulación causada por el patógeno originaría una inducción de resistencia tipo SAR que, como es sabido (Glazebrook, 2005; Gao y col., 2015), es efectiva frente a patógenos biotrofos, y la infrarregulación provocada por el antagonista estaría también de acuerdo con la generación de una defensa de tipo ISR, previamente descrita entre las respuestas tempranas en la colonización de la planta por *Trichoderma* spp. (Yedidia y col., 1999; Hermosa y col., 2012; Rubio y col., 2014), en las que el incremento de JA estaría acompañado de una reducción del SA debido al antagonismo recíproco por el diálogo molecular de ambas rutas (Spoel y col., 2003; Koornneef y Pieterse, 2008; León-Reyes y col., 2009). También, la mayor sobrerregulación de los niveles de *PR-5* en raíz de “Ac-4” y “Ac-15” en respuesta a la inoculación con el patógeno de plantones pre-inoculados con T34, con respecto a los niveles observados en ausencia del antagonista, estaría de acuerdo con la existencia de predisposición defensiva inducida por *Trichoderma* spp., un efecto derivado de su capacidad para inducir defensa en planta (Shoresh y col., 2005; Djonovic y col., 2007; Segarra y col., 2007; Tucci y col., 2011; Malmierca y col., 2012, 2015a).

Los perfiles de expresión de *PR-5* observados en hojas de “Ac-4” y “Ac-15” (Fig. 27) muestran una inducción de la ruta del SA a nivel sistémico en ambos clones. La similitud existente en los perfiles de expresión de *PR-5* tanto en raíces como en hojas entre “Ac-4” y “Ac-15” indican que las rutas defensivas mediadas por el SA estuvieron activadas a niveles local y sistémico en ambos clones de acebuché, a pesar de que difieran en la resistencia a V-138I. Sin embargo, la sobrerregulación de *PR-5* causada por el patógeno en hojas fue siempre mayor en “Ac-4” que en “Ac-15”, independientemente de que éstos estuvieran pre-inoculados con *T. harzianum* T34.

Como productos intermedios de la ruta del shikimato, un camino ausente en animales, están los aminoácidos aromáticos que, a su vez, pueden ser usados para la síntesis de proteínas y también para la síntesis de SMs, algo que ocurre con frecuencia en hongos y plantas (Vogt, 2010). Este es el caso del SA, que en plantas se forma por la vía del shikimato, bien a partir de isocorismato por acción de la isocorismato sintasa 1 (ICS1) o bien a partir del aminoácido fenilalanina por acción de la PAL. Ya que solo se observó una sobreexpresión de *PAL* en raíces de “Ac-4” a 24 h de la inoculación con V-138I, pero V-138I siempre indujo *PR-5* en raíces y hojas de “Ac-4”, podría pensarse que la síntesis de SA causada por la infección del patógeno estaría ocurriendo vía ICS1 en este clon de acebuche con resistencia al patotipo D de *V. dahliae*. En cualquier caso, se trata de una ruta de biosíntesis de la planta muy compleja ya que además de implicar metabolismo primario y secundario, con regulación compleja en muchos pasos de la ruta (Vogt, 2010; Pérez y col., 2015), puede verse afectada también por compuestos como ROS y óxido nítrico, que señalizan la formación de PAL (Gao y col., 2015), e incluso por ET que, a su vez, constituye un regulador del balance SA-JA (Pieterse y col., 2009). Y para añadir más complejidad a la ruta donde se produce el SA, en ella también se forma el triptófano, que es cabecero de numerosas vías de biosíntesis de IAA en la planta, muchas de ellas no desentrañadas aún ni siquiera en *Arabidopsis* (Sugawara y col., 2009).

Los perfiles de expresión de *ACS7* y *IAA9* observados tanto en raíces como en hojas de “Ac-4” y “Ac-15” muestran similitud. En este sentido, se conoce que las auxinas aumentan la biosíntesis de ET al inducir la expresión de las ACS (Hassan y Grossmann, 2000), pero también que el ET estimula la biosíntesis de auxinas y regula su maquinaria de transporte (Ruzicka y col., 2007).

En *A. thaliana* se sabe que ET y JA afectan a la producción de SA, ruta que está regulada, a su vez, por números factores de transcripción, entre ellos la familia de los WRKY. Se han descrito más de 70 factores de transcripción dentro de esta familia que pueden regular positiva o negativamente la ruta de defensas dependiente de SA en esa planta modelo (Eulgem y Somssich, 2007), pero actualmente hay más de 100 anotados en su genoma. En raíces del clon Ac-15, el gen *WRKY4* que es regulador negativo de señalización de respuestas dependientes de SA estuvo infrarregulado y, por tanto, permitiría la señalización de este tipo de defensas en respuesta a la infección del patógeno y la consiguiente sobrerregulación de *PR-5*. Sin embargo, en raíces de “Ac-4” la expresión de *EIN3* y *WRKY4* estuvo sobrerregulada en respuesta a la infección por el patógeno, lo que indicaría que la ruta del ET afectó a las defensas de la ruta dependiente de SA, ya que se observó también sobrerregulación de *PR-5*. En el clon Ac-4, esta señalización de defensa mediada fundamentalmente por SA-ET también fue sistémica, pues se observaron perfiles de expresión de *EIN3* y *PR-5* similares en hoja y en raíz de este clon de acebuche.

Los cambios en los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados (ejemplo: *PAL*, *ACS7*, *PR-5*) causados por el patógeno en plantones pre-inoculados con el antagonista mostraron una respuesta ondulante. Esta forma de señalizar de *Trichoderma* spp. en la planta ya es conocida (Lorito y col., 2010), modelo en 'zig-zag' (Jones y Dangl, 2006), y estas respuestas ondulantes se han observado previamente para genes de biosíntesis y de señalización de defensas dependientes de JA, SA y/o ET en tomate tratado con *Trichoderma* spp. (Rubio y col., 2014). Recientemente, se ha observado en co-cultivos *in vitro* de *A. thaliana* con *V. dahliae* y/o el endófito beneficioso *P. indica* que el patógeno sobrerregula genes marcadores de defensa de las rutas de SA, JA y ET en la planta, tanto a las 24 h como a los 14 días, y que las señales adicionales desde el endófito debían de participar en la regulación de la respuesta inmune frente a este patógeno (Sun y col., 2014).

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión de genes relacionados con defensa en planta para dos clones de acebuche, con distinta resistencia a *V. dahliae* D, indican la necesidad de más estudios que ayuden a comprender el origen de esa resistencia a cepas del patotipo D del patógeno en el clon Ac-4, a la vez, que a entender las interacciones entre las distintas rutas biosintéticas de fitohormonas que marcan las diferencias entre la inducción de defensa frente a un patógeno como el causante de la VO y frente a microorganismos beneficiosos como es el caso de cepas de *Trichoderma* spp. con demostrada capacidad para suprimir esta enfermedad. De todas formas, la disponibilidad de los genomas de olivo y acebuche es imprescindible para poder progresar en este tipo de estudios.

# CONCLUSIONES

---



1. Las cepas de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma atroviride* estudiadas en esta Tesis Doctoral son antagonistas de cepas de los patotipos defoliantes (D) y no defoliantes (ND) de *Verticillium dahliae* a través de diferentes mecanismos, aunque no todas ellas poseen la capacidad de sobrecrecer las colonias de este patógeno. La cepa T11 de *T. atroviride* posee mayor capacidad antagonista frente a los patotipos D y ND del patógeno pues los sobrecrece en la misma medida que lo hacen las cepas de *T. asperellum* pero los compuestos difusibles que produce en ausencia del patógeno, tienen mayor actividad antifúngica.
2. Los compuestos orgánicos volátiles producidos por *T. atroviride* T11 contribuyen a su antagonismo contra *V. dahliae* D V-138I porque inhiben el crecimiento de éste en cultivos discontinuos. Además, perfiles opuestos en los niveles de expresión de algunos genes de la cepa T11 en las confrontaciones sin contacto con el patógeno y consigo misma indican que esta cepa discrimina a un huésped susceptible de ser micoparasitado.
3. Las cepas estudiadas de *T. asperellum* y *T. atroviride* son capaces de colonizar la rizosfera de plantas de olivo “Picual”, si bien la extensión de la colonización rizosférica es influida por el genotipo del hongo antagonista, y las poblaciones alcanzadas se mantienen estables a lo largo del tiempo cuando la inoculación se realiza mediante riego con una suspensión de conidias comparado con la infestación del suelo con sustrato sólido.
4. Solo *T. asperellum* T25 demostró ser eficiente en incrementar significativamente el crecimiento de la planta de olivo “Picual”, y este hecho es independiente de que el antagonista se aplique mediante infestación del suelo o riego con suspensiones de conidias.
5. Ninguna de las cepas de *Trichoderma* spp. estudiadas redujo la incidencia de la Verticilosis en olivo (VO) olivo “Picual” en condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad, pero las dos cepas de *T. asperellum* ampliaron significativamente el periodo de incubación de la VO en algo más de 1 semana y redujeron significativamente el progreso temporal de los síntomas y la severidad final de éstos. Por tanto, *T. asperellum* es más eficiente que *T. atroviride* en el control de la VO.
6. El sobrecrecimiento de colonias de *V. dahliae* D V-138I por *T. atroviride* T11 está asociado con la sobrerrepresentación en el antagonista de los procesos biológicos de metabolismo y proteólisis, las funciones moleculares de actividad catalítica y de transporte, y el componente de membrana “integral de membrana”. La sobrerregulación de peptidasas en mayor extensión que otras hidrolasas como glucanasas y quitinasas, junto con el incremento significativo de la actividad proteasa que ocurre en la cepa T11 como consecuencia de sobrecrecer a V-138I, indican que la proteólisis es el mayor proceso biológico implicado en el micoparasitismo de la cepa T11 sobre este patógeno.

7. Los niveles de colonización del sistema radical y el tallo de plantones de olivo “Picual” y de los clones de acebuche Ac-4, Ac-15 y Ac-18 por *V. dahliae* D V-138I indicados por la fluorescencia observada mediante microscopía confocal concuerdan con la susceptibilidad mostrada por “Picual” y “Ac-15” y la resistencia de “Ac-4” y “Ac-18”. Observaciones similares indicaron que *Trichoderma harzianum* coloniza el sistema radical de dichos plantones en una extensión similar, sin acceder nunca a los haces xilemáticos del mismo y que, en todos los casos, la infección por el antagonista dificulta el acceso del patógeno al xilema de estas plantas.

8. Los perfiles de expresión de los genes *PAL*, *WRKY4*, *ACS7*, *IAA9* y *EIN3* en las raíces y hojas de los clones de acebuche Ac-4 (resistente) y Ac-15 (susceptible), en respuesta a su inoculación con *V. dahliae* D V-138I y/o *T. harzianum* T34 muestran que ambos hongos difieren en la señalización de respuestas de defensa contra la infección en ambos clones de acebuche y que, a su vez, el genotipo de la planta influye en la señalización de las mismas. La infección por el patógeno induce en el sistema radical sobreexpresión de *PAL*, presumiblemente asociada a la reacción de muerte celular hipersensible que es más intensa en “Ac-15”, y defensa tipo SAR de forma local y sistémica en ambos clones pero más intensa a nivel sistémico en “Ac-4”. La cepa T34 de *T. harzianum* induce por si sola defensa local de tipo ISR en ambos clones y, cuando la infección por la cepa T34 es seguida de la infección por *V. dahliae* D V-138I, este antagonista también induce una predisposición defensiva dependiente de SA en ambos clones.

# BIBLIOGRAFÍA

---



- Alfano G, Ivey ML, Cakir C, Bos JIB, Miller SA, Madden LV, Kamoun S y Hoitink HAJ.** (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97: 429-437.
- Alonso-Ramírez A, Poveda J, Martín I, Hermosa R, Monte E y Nicolás C.** (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol Plant Pathol* 15: 823-831.
- Altomare C, Norvell WA, Björkman T y 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.
- Aranda S, Montes-Borrego M, Jiménez-Díaz RM y Landa BB.** (2011). Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. *Plant Soil* 343: 329-345.
- Arias-Calderón R, León L, Bejarano-Alcázar J, Belaj A, de la Rosa R y Rodríguez-Jurado D.** (2015). Resistance to *Verticillium* wilt in olive progenies from open-pollination. *Sci Hortic* 185: 34-42.
- Arvas M, Pakula T, Lanthaler K, Saloheimo M, Valkonen M, Suortti T, Robson G y Penttilä M.** (2006). Common features and interesting differences in transcriptional responses to secretion stress in the fungi *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 7: 32.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT y col.** (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* 25: 25-29.
- Atanasova L.** (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* and *Gliocladium* in genome perspective. En *Biotechnology and biology of Trichoderma* (eds. Gupta VS, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I y Tuohy M), Elsevier: Waltham, EE.UU. pp. 25-40.
- Atanasova L, Jaklitsch WM, Komon-Zelazowska M, Kubicek CP y Druzhinina IS.** (2010). Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulose producer *Hypocrea jecorina*/*T. reesei*. *Appl Environ Microbiol* 76: 7259-7267.
- Atanasova L, Le Crom S, Gruber S, Couplier F, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP y Druzhinina IS.** (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14: 121.
- Bae SJ, Mohanta TK, Chung JY, Ryu M, Park G, Shim S, Hong SB, Seo H, Bae DW, Bae I, K JJ y Bae H.** (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biol Control* 92: 128-138.
- Bae H, Sicher RC, Kim MS, Kim SH, Strem MD, Melnick RL y Bailey BA.** (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J Exp Bot* 60: 3279-3295.
- Baúdez AG, Gómez P, Del Río JA y Ortuño A.** (2007). Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defence mechanism. *J Agr Food Chem* 55: 3373-3377.
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Crozier J, Thomas SE, Samuels GJ, Vinyard BT y Holmes KA.** (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biol Control* 46: 24-35.
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Roberts DP, Thomas SE, Crozier J y Holmes KA.** (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224: 1449-1464.

- Barranco D.** (2001). Variedades y patrones. En *El cultivo del olivo* 4ª Ed. (eds. Barranco D, Fernández-Escobar R y Rallo L), Mundi-Prensa: Valencia, España. pp. 63-89.
- Bhat RG, Smith RF, Koike ST, Wu BM y Subbarao KV.** (2003). Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Dis* 87: 789-797.
- Bhat RG y Subbarao KV.** (1999). Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89: 1218-1285.
- Battaglia D, Bossi S, Cascone P, Digilio MC, Duran-Prieto J, Fanti P, Guerrieri E, Iodice L, Lingua G, Lorito M, y col.** (2013). Tomato below ground-above ground interactions: *Trichoderma longibrachiatum* affects the performance of *Macrosiphum euphorbiae* and its natural antagonists. *Mol Plant Microbe Int* 26: 1249-1256.
- Beckman CH.** (1981). Modelling the succession of host-parasite interactions in vascular diseases of plants. Pags. 15-35 en: Pathobiology of *Verticillium* species. Pro. 3<sup>rd</sup> International Symposium on *Verticillium*, Bari, Italy. *Phytopathol Mediterr* 23: 95-221.
- Bejarano-Alcázar J, Blanco-López MA, Melero-Vara JM y Jiménez-Díaz RM.** (1996). Etiology, importance, and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Dis* 80: 1233-1238.
- Belaj A, Trujill I, de la Rosa R, Rallo L y Giménez MJ.** (2001). Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J Amer Soc Hort Sci* 126: 64-71.
- Benhamou N y Chet I.** (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86: 405-416.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC y Codón AC.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7: 249-260.
- Benjamini Y y Hochberg Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc* 57: 289-300.
- Bissett J.** (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot* 69: 2357-2372.
- Blanco-López MA, Jiménez-Díaz RM y Caballero JM.** (1984). Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathol Mediterr* 23: 1-8.
- Bonaccorsi ED, Ferreira AJS, Chambergo FS, Ramos SP, Mantovani MC, Farah JPS, Sorio CS, Gombert AK, Tonso A y El-Dorry H.** (2006). Transcriptional response of the obligate aerobic *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen. *Biochemistry* 45: 3912-3924.
- Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brotman Y, Briff E, Viterbo A y Chet I.** (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147: 779-189.
- Bruce TJ y Pickett JA.** (2007). Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Curr Op Plant Biol* 10: 387-392.
- Brunner K, Peterbauer CK, Mach RL, Lorito M, Zeilinger S y Kubicek CP.** (2003). The NagI N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43: 289-295.
- Caballero JM y Del Río C.** (2001). Métodos de multiplicación. . En *El cultivo del olivo* 4ª Ed. (eds. Barranco D, Fernández-Escobar R y Rallo L), Mundi-Prensa: Madrid, España. pp. 91-117.
- Caballero JM, Pérez-Hernández J, Blanco-López MA y Jiménez-Díaz RM.** (1980). Olive, a new host of *Verticillium dahliae* in Spain. En Proc 5<sup>th</sup> Cong Medit Phytopath Union. Patras, Grecia. Pp. 50.

- Calderón R, Lucena C, Trapero-Casas JL, Zarco-Tejada PJ y Navas-Cortés JA.** (2014). Soil temperature determines the reaction of olive cultivars to *Verticillium dahliae* pathotypes. *PLOS ONE* 9: e110664.
- Cao L, Jiang M, Zeng Z, Du A, Tan H y Liu Y.** (2008). *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard [*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey] in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere* 71: 1769-1773.
- Caporale AG, Sommella A, Lorito M, Lombardi N, Azam SM, Pigna M y Ruocco M.** (2014). *Trichoderma* spp. alleviate phytotoxicity in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) irrigated with arsenic-contaminated water. *J Plant Physiol* 171: 1378-1384.
- Cardoza RE, Hermosa MR, Vizcaíno JA, González F, Llobell A, Monte E y Gutiérrez S.** (2007). Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity. *Fungal Genet Biol* 44: 269-283.
- Cardoza RE, Vizcaíno JA, Hermosa MR, Monte E y Gutiérrez S.** (2006). A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast and *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Microbiol* 44: 383-395.
- Chacón M, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell A y Delgado-Jarana J.** (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol* 10: 19-27.
- Chambergo FS, Bonaccorsi ED, Ferreira AJ, Ramos AS, Ferreira Junior JR, Abrahao-Neto J, Farah JP y El-Dorry H.** (2002). Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem* 277: 13983-13988.
- Chang YC, Baker R, Kleifeld O y Chet I.** (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* 70: 145-148.
- Chaverri P, Castlebury LA, Samuels GJ y Geiser DM.** (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol* 27: 302-313.
- Chaverri P, Samuels GJ y Stewart EL.** (2001). *Hypocrea virens* sp nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* 93:1113-1124.
- Chen L, Yang X, Raza W, Li J, Liu Y, Qiu M y Shen Q.** (2011). *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1653-1663.
- Chet I, Benhamou N y Haran S.** (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 2) (eds. Kubicek CP y Harman GE), Taylor & Francis: Londres, Reino Unido. pp. 153-172.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B y Staskawicz BJ.** (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814.
- Civantos L.** (2001). La olivicultura en el mundo y en España. En: *El cultivo del olivo* 4ª Ed. (eds. Barranco D, Fernández-Escobar R y Rallo L), Mundi-Prensa: Madrid, España. pp. 19-34.
- Claros GM, Crespillo R, Aguilar ML y Cánovas FM.** (2000). DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* 166: 131-142.
- Collado-Romero M, Mercado-Blanco J, Olivares-García C y Jiménez-Díaz RM.** (2008). Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. *Phytopathology* 98: 1019-1028.
- Collado-Romero M, Mercado-Blanco J, Olivares-García C, Valverde-Corredor A y Jiménez-Díaz RM.** (2006). Molecular variability within and among *Verticillium dahliae*

vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology* 96: 485-495.

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

**Dana DM, Pintor-Toro JA y Cubero B.** (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* 142: 722-730.

**De Andrés F.** (1991). Enfermedades y plagas del olivo. 2ª Ed. Riquelme y Vargas Ediciones: Jaén España. pp. 646.

**Degenkolb T, Gräfenhan T, Nirenberg HI, Gams W y Brückner H.** (2006). *Trichoderma brevicompactum* complex: Rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). *J Agric Food Chem* 54: 7047-7061.

**Degenkolb T, von Döhren H, Nielsen KF, Samuels GJ y Brückner H.** (2008). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem Biodiversity* 5: 671-680.

**De Jonge R, Bolton MD, Kombrink A, van den Berg GC, Yadeta, KA y Thomma BP.** (2013). Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Res* 23: 1271-1282.

**De Jonge R y Thomma BP.** (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity?. *Trends Microbiol* 17: 151-157.

**De Jonge R, van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MH, Thomma BP.** (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin triggered immunity in plants. *Science* 329: 953-955.

**De Jonge R, van Esse HP, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Saber MK, Zhang Z, Usami T, Lievens B, Subbarao KV y col.** (2012). Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and rna sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 5110-5115.

**De la Cruz J, Pintor JA, Benítez T y Llobel A.** (1995a). Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J Bacteriol* 177: 1864-1871.

**De la Cruz J, Pintor JA, Benítez T, Llobel A y Romero LC.** (1995b). A novel endo  $\beta$ -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* 177: 6937-6945.

**Delgado-Jarana J, Sousa S, González F, Rey M y Llobel A.** (2006). *ThHog1* controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 152: 1687-1700.

**Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC y Klessig DF.** (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis book* 9: e0156.

**Deng S, Lorito M, Penttilä M y Harman GE.** (2007). Overexpression of an endochitinase gene (*ThEn-42*) in *Trichoderma atroviride* for increased production of antifungal enzymes and enhanced antagonist action against pathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol* 142: 81-94.

**Derksen H, Rampitsch C y Daayf F.** (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci* 207: 79-87.

**De Saint M y Rep M.** (2015). The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. *Int J Mol Sci* 16: 23970-23993.

**Diener SE, Dunn-Coleman N, Foreman P, Houfek TD, Teunissen PJM, Solingen P y Dean RA.** (2004). Characterization of the protein processing and secretion pathways in a

comprehensive set of expressed sequence tags from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol Lett* 230: 275-282.

**Djonovic S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR y Kenerley CM.** (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interac* 19: 838-853.

**Djonovic S, Vargas WA, Kolomiets MV, Horndeski M, Wiest A y Kenerley CM.** (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol* 145: 875-889.

**Dodd SL, Lieckfeldt E y Samuels GJ.** (2003). *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40.

**Dodds PN y Rathjen JP.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539-548.

**Domínguez S.** (2014). Estudio transcriptómico de la interacción *Trichoderma*-tomate. Expresión del gen *amds* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma harzianum* y su papel en el metabolismo del nitrógeno y la respuesta de defensa de la planta. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.

**Donoso EP, Bustamante RO, Carú M y Niemeyer HM.** (2008). Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Appl Environ Microbiol* 74: 1412-1417.

**Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Atanasova L, Seidl V y Kubicek CP.** (2010). Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it. *PLOS ONE* 5: e9191.

**Druzhinina IS, Kopchinskiy A y Kubicek CP.** (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.

**Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E y Kubicek CP.** (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9: 749-759.

**Elad Y, Barak R y Chet I.** (1984). Parasitism of esclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol Biochem* 16: 381-386.

**Elad Y, Chet I y Henis Y.** (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica* 9: 59-67.

**El-Katatny MH, Gudelj M, Robra KH, Elnaghy MA y Gubitz GM.** (2001). Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 137-143.

**Eulgem T y Somssich I.** (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10: 366-371.

**Eynck C, Koopmann B, Grunewaldt-Stoecker G, Karlovsky P y von Tiedemann A.** (2007). Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Eur J Plant Pathol* 118: 259-274.

**Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE y Mello CC.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.0

**Flor HH.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9: 275-296.

**Flores A, Chet I y Herrera-Estrella A.** (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr Genet* 31: 30-37.

- Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS y Ward M.** (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 278: 31988-31997.
- Fradin EF y Thomma BP.** (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Pathol* 7: 71-86.
- Fradin EF, Zhang Z, Juarez-Ayala JC, Castroverde CD, Nazar RN, Robb J, Liu CM y Thomma BP.** (2009). Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiol* 150: 320-332.
- Frandsen RJ, Andersson JA, Kristensen MB. y Giese H.** (2008). Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi. *BMC Mol Biol* 9: 70.
- Freimoser FM, Screen S, Bagga S, Hu G y St Leger RJ.** (2003). Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 149: 239-247.
- Friedl MA y Druzhinina IS.** (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology* 158: 69-83.
- Fu CH, Chen YW, Hsiao YY, Pan ZJ, Liu ZJ, Huang YM, Tsai WC y Chen HH.** (2011). OrchidBase: a collection of sequences of the transcriptome derived from orchids. *Plant Cell Physiol* 52: 238-243.
- Gams W, van der Aa HA, van der Okaats-Niterink AJ, Samson RA y Stalpers JA.** (1987). CBS Course of Mycology. Centralbureau voor Schimmel cultures: Berna, Suiza.
- Ganassi S, Grazioso P, De Cristofaro A, Fiorentini F, Sabatini MA, Evidente A y Altomare C.** (2016). Long chain alcohols produced by *Trichoderma citrinoviride* have phagodeterrent activity against the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi*. *Front Microbiol* 7: 297.
- Gao W, Long L, Xu L, Lindsey K, Zhang X y Zhu L.** (2015). Suppression of the homeobox gene HDTF1 enhances resistance to *Verticillium dahliae* and *Botrytis cinerea* in cotton. *J Integr Plant Biol* (Doi: 10.1111/jipb.12432)
- Gao F, Zhou BJ, Li GY, Jia PS, Li H y Zhao YL.** (2010). A glutamic acid-rich protein identified in *V. dahliae* from an insertional mutagenesis affects microesclerotial formation an insertional mutagenesis affects microsclerotial formation and pathogenicity. *PLOS ONE* 5: e15319.
- Garnica-Vergara A, Barrera-Ortiz S, Muñoz-Parra E, Raya-González J, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, Ruiz-Herrera LF y López-Bucio J.** (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and *ETHYLEN INSENSITIVE 2* functioning. *New Phytol* 209: 1496-1512.
- Ge H, Walhout AJ y Vidal M.** (2003). Integrating “omic” information: a bridge between genomics and systemic biology. *Trends Genet* 19: 551-560.
- Genre A.** (2008). Confocal microscopy and plant cell biology: A perfect match. *Plant Biosyst* 142: 348-354.
- Geremía RA, Goldman GH, Jacobs D, Ardrtes W, Vila SB, Montagu M y Herrera-Estrella A.** (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol Microbiol* 8: 603-613.
- Glazebrook J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205-227.

- Goldman GH, Pellizzon CH, Marins GH, McInerney JO y Goldman MHS.** (1998). *Trichoderma* spp. genome and gene structure. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1) (eds. Kubicek CP y Harman GE), Taylor & Francis: Londres, Reino Unido. pp. 209-224.
- Gómez-Lama Cabanás C, Schilirò E, Valverde-Corredor A y Mercado-Blanco J.** (2014). The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. *Front Microbiol* 5: 427.
- Gómez-Lama Cabanás, C, Schilirò E, Valverde-Corredor A y Mercado-Blanco J.** (2015). Systemic responses in a tolerant olive (*Olea europaea* L.) cultivar upon root colonization by the vascular pathogen *Verticillium dahliae*. *Front Microbiol* 6: 928.
- Grover A.** (2012). Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critic Rev Plant Sci* 31: 57-73.
- Gruber S y Seidl-Seiboth V.** (2012). Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158: 26-34.
- Hadibarata T, Tachibana S y Itoh K.** (2007). Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Pak J Biol Sci* 10: 2535-2543.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Handelsman J y Stabb EV.** (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8: 1855-1869.
- Harman GE.** (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- Harman GE, Bjorkman T, Ondik KL y Shores M.** (2008). Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks Pest Manage* 19: 24-29.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I y Lorito M.** (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2: 43-56.
- Harris DC.** (1998). Manipulation of *V. dahliae*. En *A compedium of Verticillium wilt in tree species* (eds. Hienmstra JA y Harris DC), Posen y Looijen: Wageningen, Holanda. pp. 49-50.
- Hermosa R, Cardoza RE, Rubio MB, Gutiérrez S y Monte E.** (2014). *Trichoderma*: Their uses and application in bioengineering and biotechnology. En *Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of Trichoderma*. (eds. Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Druzhinina I, Upadhyay RS y Tuohy M), Elsevier: Amsterdam, Holanda. pp. 125-137.
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Díaz-Mínguez JM, Castro C, Monte E y García-Acha I.** (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol* 66: 1890-1898.
- Hermosa MR, Keck E, Chamorro I, Rubio MB, Sanz L, Vizcaíno JA, Grondona I y Monte E.** (2004). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol Res* 108: 897-906.
- Hermosa R, Rubio MB, Cardoza RE, Nicolás C, Monte E y Gutiérrez S.** (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int Microbiol* 16: 69-80.
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I y Monte E.** (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.
- Hoagland DR y Arnon DL.** (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp Station Circ* 347: 1-32.
- Hoffmeister D y Keller NP.** (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *J Nat Prod* 24: 393-416.
- Holwerda BC y Rogers JC.** (1992). Purification and characterization of aleurain: a plant thiol protease functionally homologous to mammalian cathepsin H. *Plant Physiol* 99: 848-855.

- Hooykaas PJJ, Roobol C, y Schilperoort RA.** (1979). Regulation of the transfer of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Gen Microbiol* 110: 99-109.
- Hoppenau CE, Tran V-T, Kusch H, Abhauer KP, Landesfeind M, Meinicke P, Popova B, Braus-Stromeier SA y Braus GH.** (2014) *Verticillium dahliae* VdTHI4, involved in thiazole biosynthesis, stress response and DNA repair functions, is required for vascular disease induction in tomato. *Environ Exp Bot* 108: 14-22.
- Howell CR.** (2003). Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* 87: 4-7.
- Howell CR.** (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96: 178-180.
- Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD y Puckhaber LS.** (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248-252.
- Howell CR y Stipanovic RD.** (1995). Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85: 469-472.
- Hoyos-Carvajal L, Orduz S y Bissett J.** (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol Control* 51: 409-416.
- Iaria LD, Chiappetta A y Muzzalupo I.** (2016). A de novo transcriptomic approach to identify flavonoids and anthocyanins “switch-off” in olivo (*Olea europaea* L.) drupes at different stages of maturation. *Front Plant Sci* 6: 1246.
- Inbar J y Chet I.** (1996). The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv Exp Med Biol* 408: 229-231.
- Inderbitzin P, Bostock RM, Davis RM, Usami T, Platt HW y Subbarao KV.** (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species *PLOS ONE* 6: e28341.
- Inoue H, Nojima H y Okayama H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U y Speed TP.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264.
- Jiménez-Díaz RM.** (2010). Verticilosis del olivo. En *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado* (eds. Jiménez-Díaz RM y Montesinos E), Phytoma: Valencia, España. pp. 225-249.
- Jiménez-Díaz RM, Cirulli M, Bubici G, Jiménez-Gasco MM, Antoniou PP y Tjamos EC.** (2012). *Verticillium* wilt: a major threat to olive production: current status and future prospects for its management. *Plant Dis* 96: 304-329.
- Jiménez-Díaz RM, Melgarejo P, Bonnaterra A, Landa BB, Monte E y Montesinos E.** (2010). Manejo integrado de enfermedades causadas por hongos. En *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos* (eds. Jiménez-Díaz RM y Montesinos E), Phytoma: Valencia, España. pp. 87-114.
- Jiménez-Díaz, RM, Olivares-García C, Landa BB, Jiménez-Gasco MM y Navas-Cortés JA.** (2011). Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology* 101: 304-315.
- Jiménez-Díaz RM, Olivares-García C, Navas-Cortés JA, Landa BB y Jiménez-Gasco MM.** (2008a). A region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* olive in Andalucía, southern Spain. *Phytopathology* 98:S75.

- Jiménez-Díaz RM, Rodríguez-Jurado D, Landa BB, Trapero-Casas JL y Navas-Cortés JA.** (2008b). Dispersión de la Verticilosis a través de las hojas de olivo infectadas por el patotipo defoliante. *Vida Rural* 265: 40-44.
- Jiménez-Díaz RM, Rodríguez-Jurado D, Navas-Cortés JA, Mercado-Blanco J y Trapero-Casas JL.** (2003). Estrategias de control de la Verticilosis del olivo. *Vida Rural* 176: 36-40.
- Jiménez-Díaz RM, Tjamos EC y Cirulli M.** (1998). Verticillium wilt of major tree hosts: olive. En *A compendium of Verticillium wilt in tree species* (eds. Hienmstra JA y Harris DC), Posen y Looijen: Wageningen, Holanda. pp. 13-16.
- Jiménez-Díaz RM, Trapero-Casas JL, Boned J, Landa BB y Navas-Cortés JA.** (2009). Uso del formulado fúngico Bioten® para la protección biológica de plantones de olivo contra la Verticilosis causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. *Bol San Veg Plagas* 35: 595-615.
- Jiménez-Fernández D, Landa BB, Kang S, Jiménez-Díaz RM y Navas-Cortés JA.** (2013). Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interactions between chickpea cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Races. *PLOS ONE* 8: e61360.
- Jiménez-Fernández D, Trapero-Casas JL, Landa BB, Navas-Cortés JA, Bubici G, Cirulli M y Jiménez-Díaz RM.** (2016). Characterization of resistance against the olive-defoliating *Verticillium dahliae* pathotype in selected clones of wild olive. *Plant Pathology* (Doi: 10.1111/ppa.12516).
- Jiménez-Gasco MM, Malcom GM, Berbegal M, Armengol J y Jiménez-Díaz RM.** (2014). Complex molecular relationship between vegetative compatibility groups (VCGs) in *Verticillium dahliae*: VCGs do not always align with clonal lineages. *Phytopathology* 104: 650-659.
- Joachim TR y Rowe RC.** (1990). Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* 80:1160-1166.
- Jones JD y Dangl JL.** (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Ju W, Yoo BC, Kim IJ, Kim JW, Kim SC y Lee HP.** (2009). Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high density oligonucleotide microarrays. *Oncol Res* 18: 47-56.
- Kabir Z, Bhat RG y Subbarao KV.** (2004). Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. *Plant Dis* 88: 49-55.
- Kazan K y Manners JM.** (2012). JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* 17: 22-31.
- Kazan K y Manners JM.** (2013). MYC2: the master in action. *Mol Plant* 6: 686-703.
- Keller NP, Turner G y Bennett JW.** (2005). Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3: 937-947.
- Keswani C, Mishra S, Sarma BK, Singh SP y Sigh HB.** (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 533-544.
- Keszker A, Forgács E, Kótai L, Vizcaíno JA, Monte E y García-Acha I.** (2000). Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 38: 421-424.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC y Stalpers JA.** (2001). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, CABI: Wallingford, Reino Unido.

- Klein D y Eveleigh DE.** (1998). Ecology of *Trichoderma*. En *Trichoderma and Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics (vol.1) (eds. Kubicek CP y Harman GE), Taylor & Francis: Londres, Reino Unido. pp. 57-73.
- Klimes A, Amyotte SG, Grant S, Kang S y Dobinson KF.** (2008). Microesclerotia development in *Verticillium dahliae*: regulation and differential expression of the hydrophobin gene *VDH1*. *Fungal Genet Biol* 45: 1525-1532.
- Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, Veronese P, Gold SE, Thomma BP, Chen Z, Henrissat B, Lee YH, Park J y col.** (2011). Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathog* 7: e1002137.
- Kombrink A.** (2014). Functional analysis of LysM effectors secreted by fungal plant pathogens. Tesis doctoral. Wageningen University. Wageningen, Holanda.
- Koornneef A y Pieterse CMJ.** (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol* 146: 839-844.
- Korolev N, David DR y Elad Y.** (2008). The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma* induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Biocontrol* 53: 667-683.
- Koshle S, Mahesh S y Swamy SN.** (2016). Isolation and identification of *Trichoderma harzianum* from groundwater: An effective biosorbent for defluoridation of groundwater. *J Environ Bio* 37: 135-140.
- Kubicek CP, Bissett C, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger CM y Szakacs G.** (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol* 38: 310-319.
- Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK y col.** (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol* 12: R40.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Borner T y 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.
- Lazo GR, Stein PA y Ludwing RA.** (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* 9: 963-967.
- Leelavathi MS, Vani L y Reena P.** (2014). Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3: 96-103.
- León-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Körbes AP, Memelink J, Pieterse CMJ y Ritsema T.** (2009) Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 187-197.
- Levin A, Lavee S y Tsror L.** (2003). Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv Picual) and its effects on yield under saline conditions. *Plant Pathol* 52: 212-218.
- Levy J e Isaac I.** (1976). Colonization of host tissue of varying resistance to *Verticillium dahliae*. *Trans Br Mycol Soc* 103: 4324-4331.
- Lewis, JA y Papavizas GC.** (1984). A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology* 74: 1240-1244.
- Li DC.** (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360.
- Li HL y Guo H.** (2007). Molecular basis of the ethylene signaling and response pathway in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul* 26: 106-117.

- Li HY, Luo Y, Zhang XZ, Shi WL, Gong ZT, Shi M, Chen LL, Chen XL, Zhang YZ y Song XY.** (2014). Trichokonins from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2 induce resistance against Gram-negative *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Chinese cabbage. *FEMS Microbiol Lett* 354: 75-82.
- Liang PH, Ko TP y Wang AHJ.** (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem* 269: 3339-3354.
- Lieckfeldt E, Samuels GJ, Nirenberg HI y Petrini O.** (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl Environ Microbiol* 65: 2418-2428.
- Limón MC, Pintor-Toro JA y Benítez T.** (1999). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89: 254-261.
- Liu SY, Chen JY, Wang JL, Li L, Xiao HL, Adam SM y Dai XF.** (2013a). Molecular characterization and functional analysis of a specific secreted protein from highly virulent defoliating *Verticillium dahliae*. *Gene* 529: 307-316.
- Liu D, Coloe S, Baird R y Pedersen J.** (2000). Rapid Mini-Preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 38: 471.
- Liu SP, Hong YB, Wu Z, Ma YS, Jue DW, Xie C, Zhu YP, Chen M y Yang Q.** (2013b). Protein extract of tobacco expressing *StoVe1* gene inhibits *Verticillium dahliae* proliferation. *Cze J Genet Plant Breed* 49: 58-64.
- Liu T, Song T, Zhang X, Yuan H, Su L, Li W, Xu J, Liu S, Chen L, Chen T y col.** (2014). Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nat Commun* 5: 4686.
- Liu PG y Yang Q.** (2005). Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Res Microbiol* 156: 416-423.
- Livak KJ y Schmittgen TD.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Lo CT, Nelson EB y Harman GE.** (1996). Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* 80: 730-741.
- López-Escudero FJ y Blanco-López MA.** (2007). Relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of Verticillium wilt of olive. *Plant Dis* 91: 1372-1378.
- López-Escudero FJ, del Río C, Caballero JM y Blanco-López, MA.** (2004). Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *Eur J Plant Pathol* 110: 79-85.
- López-Escudero FJ, Mercado-Blanco J, Roca JM, Valverde-Corredor A y Blanco-López MA.** (2010). Verticillium wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): relation with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathol Mediterr* 49: 370-380.
- Lorenzo O y Solano R.** (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* 8: 532-540.
- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL y Di Pietro A.** (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S y Scala F.** (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7860-7865.
- Lorito M, Woo SL, Harman GE y Monte E.** (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'Omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* 48: 395-417.

- Lu Z, Tombolini R, Woo SL, Zeilinger S, Lorito M y Jansson JK.** (2004). *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Appl Environ Microbiol* 70: 3073-3081.
- Luo X, Xie C, Dong J, Yang X y Sui A.** (2014). Interactions between *Verticillium dahliae* and its host: vegetative growth, pathogenicity, plant immunity. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 6921-6932.
- Mach RL, Schindler M y Kubicek CP.** (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet* 25: 567-570.
- Mach RL y Zeilinger S.** (1998). Genetic transformation of *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1) (eds. Kubicek CP y Harman GE), Taylor & Francis: Londres, Reino Unido. pp. 225-242.
- Madden L, Hughes G y Van den Bosch F.** (2007). The study of plant disease epidemics. APS Press: St. Paul, EE.UU. pp. 432.
- Maeda H, Sano M, Maruyama Y, Tanno T, Akao T, Totsuka Y, Endo M, Sakurada R, Yamagata Y, Machida M y col.** (2004). Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 74-83.
- Malmierca MG, Barua J, McCormick SP, Izquierdo-Bueno I, Cardoza RE, Alexander NJ, Hermosa R, Collado IG, Monte E y Gutiérrez S.** (2015a). Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defence priming. *Environ Microbiol* 17: 1103-1118.
- Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Collado IG, Hermosa R, Monte E y Gutiérrez S.** (2013). Relevance of trichothecenes in fungal physiology: disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genet Biol* 53: 22-33.
- Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Hermosa RM, Monte E y Gutiérrez S.** (2012). Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Appl Environ Microbiol* 78: 4856-4868.
- Malmierca MG, Izquierdo-Bueno I, McCormick SP, Cardoza RE, Alexander NJ, Moraga J, Gomes EV, Proctor RH, Collado IG, Monte E y Gutiérrez S.** (2015b). Botrydial and botcinins produced by *Botrytis cinerea* regulate the expression of *Trichoderma arundinaceum* genes involved in trichothecene biosynthesis. *Mol Plant Pathol* (Doi: 10.1111/mpp.12343).
- Malmierca MG, McCormick SP, Cardoza RE, Alexander NJ, Monte E y Gutiérrez S.** (2015c). Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. *Environ Microbiol* 17: 2628-2646.
- Maor R, Puyesky M, Horwitz BA y Sharon A.** (1998). Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol Res* 102: 491-496.
- Marra R, Ambrosino P, Carbone V, Vinale F, Woo SL, Ruocco M, Ciliento R, Lanzuise S, Ferraioli S, Soriente I, Gigante S, Turrà D, Fogliano V, Scala F y Lorito M.** (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr Genet* 50: 307-321.
- Martínez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D y col.** (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnol* 26: 553-560.
- Martínez C, Blanc F, Le Claire E, Besnard O, Nicole M y Baccou JC.** (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol* 127: 334-344.

- Martos-Moreno C, López-Escudero FJ y Blanco-López MA.** (2006). Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *HortScience* 41: 1313-1316.
- Maruthachalam K, Klosterman SJ, Anchieta A, Mou B y Subbarao KV.** (2013). Colonization of spinach by *Verticillium dahliae* and effects of pathogen localization on the efficacy of seed treatments. *Phytopathology* 103: 268-280.
- Maruthachalam K, Klosterman SJ, Kang S, Hayes RJ y Subbarao KV.** (2011). Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated T-DNA insertional mutagenesis. *Mol Biotechnol* 49: 209-221.
- Maruthachalam K, Klosterman SJ, Kang S, Hayes RJ y Subbarao KV.** (2011). Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis. *Mol Biotechnol* 49: 209-221.
- Mastouri F, Bjorkman T y Harman GE.** (2010). Seed treatments with *Trichoderma harzianum* alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* 100: 1213-1221.
- Masunaka A, Hyakumachi M y Takenaka S.** (2011). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ* 26: 128-134.
- Mercado-Blanco J, Collado-Romero M, Parrilla-Araujo S, Rodríguez-Jurado D y Jiménez-Díaz RM.** (2003b). Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiol Mol Plant Pathol* 63: 91-105.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Hervás A y Jiménez-Díaz RM.** (2004). Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol Control* 30: 474-486.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Parrilla-Araujo S y Jiménez-Díaz RM.** (2003a). Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Dis* 87: 1487-1494.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Pérez-Artés E y Jiménez-Díaz RM.** (2001). Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *Plant Pathol* 50: 609-619.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Pérez-Artés E y Jiménez-Díaz RM.** (2002). Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *Eur J Plant Pathol* 108: 1-13.
- Migheli Q, González-Candelas L, Dealessi L, Camponogara A y Ramón-Vidal D.** (1998). Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the  $\beta$ -1,4-endoglucanase gene *eglI* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Biol Control* 88: 673-677.
- Milgroom MG, Jiménez-Gasco MM, Olivares-García C, Drott MT y Jiménez-Díaz RM.** (2014). Recombination between clonal lineages of the asexual fungus *Verticillium dahliae* detected by genotyping by sequencing. *PLOS ONE* 9: e106740.
- Milgroom MG, Jiménez-Gasco MM, Olivares-García C y Jiménez-Díaz RM.** (2016). Clonal expansion and migration of a highly virulent, defoliating lineage of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* (Doi: 10.1094/PHYTO-11-15-0300-R).
- Miller JH.** (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
- Monte, E.** (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* 4: 1-4.

- Monteiro VN, do Nascimento Silva R, Steindorff AS, Costa FT, Noronha EF, Ricart CA, de Sousa MV, Vainstein MH y Ulhoa CJ.** (2010) New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr Microbiol* 61: 298-305.
- Montero-Barrientos M, Cardoza RE, Gutiérrez S, Monte E y Hermosa MR.** (2007). The heterologous overexpression of *hsp23*, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. *Curr Genet* 52: 45-53.
- Montero-Barrientos M, Hermosa R, Cardoza RE, Gutiérrez S y Monte E.** (2011). Functional analysis of the *Trichoderma harzianum nox1* gene, encoding an NADPH oxidase, relates production of reactive oxygen species to specific biocontrol activity against *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol* 77: 3009-3016.
- Montero-Barrientos M, Hermosa R, Cardoza RE, Gutiérrez S, Nicolás C y Monte E.** (2010). Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *J Plant Physiol* 167: 659-665.
- Montero M, Sanz L, Rey M, Llobell A y Monte E.** (2007). Cloning and characterization of *bgn16.3*, coding for a  $\beta$ -1,6-glucanase expressed during *Trichoderma harzianum* mycoparasitism. *J Appl Microbiol* 103: 1291-1300.
- Montero M, Sanz L, Rey M, Monte E y Llobell A.** (2005). BGN16.3, a novel acidic beta-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *FEBS J* 272: 3441-3448.
- Morán-Diez E, Hermosa R, Ambrosino P, Cardoza RE, Gutiérrez S, Lorito M y Monte E.** (2009). The *ThPG1* endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 1021-1031.
- Morán-Diez E, MB, Domínguez S, Hermosa R, Monte E y Nicolás C.** (2012). Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *J Plant Physiol* 169: 614-620.
- Morath SU, Hung R y Bennett JW.** (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis in their biotechnological applications. *Fungal Biol Rev* 26: 73-83.
- Mozo T y Hooykas PJ.** (1991). Electroporation of megaplasmids into *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol* 16: 917-918.
- Mukherjee PK, Buensanteai N, Morán-Diez ME, Druzhinina IS y Kenerley CM.** (2012). Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRP hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. *Microbiology* 158: 155-165.
- Mukherjee M, Hadar R, Mukherjee PK y Horwitz BA.** (2003). Homologous expression of a mutated  $\beta$ -tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *J Appl Microbiol* 95: 861-867.
- Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmoll M y Kenerley CM.** (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annu Rev Phytopathol* 51: 105-129.
- Mukherjee PK, Wiest A, Ruiz N, Keightley A, Moran-Diez ME, McCluskey K, Pouchus YF y Kenerley CM.** (2011). Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *J Biol Chem* 286: 4544-4554.
- Mullins E, Chen X, Romaine P, Raina R, Feiser D y Kang S.** (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91: 173-180.
- Mullis KB y Faloona FA.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.

- Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJM, Habelstrup Kh y Gupta KJ.** (2013). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* 5, pls052.
- Mutawila C, Vinale F, Halleen F, Lorito M y Mostert L.** (2016). Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathol* 65: 104-115.
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M y Snyder M.** (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320: 1344-1349.
- Naito K, Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T y Ichinose Y.** (2008). Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1165-1174.
- Navas-Cortés JA, Landa BB, Mercado-Blanco J, Trapero-Casas JL, Rodríguez-Jurado D y Jiménez-Díaz RM.** (2008). Spatiotemporal analysis of spread of *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology* 98: 167-180.
- Nelson MA, Kang S, Braun EL, Crawford ME, Dolan PL, Leonard PM, Mitchell J, Armijo AM, Bean L, Blueyes E y col.** (1997). Expressed sequences from conidial, mycelial and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 21: 348-363.
- Nene YL y Haware MP.** (1980). Screening chickpea for resistance to wilt. *Plant Dis* 64: 379-380.
- Neumann MJ y Dobinson KF.** (2003). Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet Biol* 38: 54-62.
- Nicolás C, Hermosa R, Rubio MB, Mukherjee PK y Monte E.** (2014). *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant Sci* 228: 71-78.
- Niño-Sánchez J, Tello V, Casado-del Castillo V, Thon MR, Benito EP y Díaz-Mínguez JM.** (2015). Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front Microbiol* 6: 234.
- Novo M, Gayoso CM, Pomar F, Lucas MM, Barceló AR y Merino F.** (2007). Sulphur accumulation after *Verticillium dahliae* infection of two pepper cultivars differing in degree of resistance. *Plant Pathol* 56: 998-1004.
- Novo M, Pomar F, Gayoso C y Merino F.** (2006). Cellulase activity in isolates of *V. dahliae* differing in aggressiveness. *Plant Dis* 90: 155-160.
- O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J y Klee HJ.** (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J* 25: 315-323.
- Omman MR, Lehner S, Escobar Rodríguez C, Brunner K y Zeilinger S.** (2012). The seven transmembrane receptor Gpr1 governs process relevant for the antagonistic interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. *Microbiology* 158: 107-118.
- Osborn A.** (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet* 26: 449-457.
- Palomares-Rius JE, Castillo P, Trapero-Casas JL y Jiménez-Díaz RM.** (2016). Infection by *Meloidogyne javanica* does not breakdown resistance to defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in selected clones of wild olive. *Sci Hort* 199: 149-157.

- Pantelides IS, Tjamos SE, Striglis IA, Chatzipavlidis I y Paplomatas EJ.** (2009). Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. *Biol Control* 50: 30-36.
- Pantou MP, Kouvelis V y Typas M.** (2006). The complete mitochondrial genome of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*: a novel gene order for *Verticillium* and a diagnostic tool for species identification. *Curr Genet* 50: 125-136.
- Paulitz TC.** (1990). Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. En *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases* (eds. Baker RR y Dunn PE), Alan R. Liss: Nueva York, EE.UU. pp.713-724.
- Pegg GF y Brady BL.** (2002). *Verticillium* wilts. CABI: Wallingford, Inglaterra, Reino Unido.
- Pérez E., Rubio MB, Cardoza RE, Gutiérrez S, Bettiol W, Monte E y Hermosa R.** (2015). The importance of chorismate mutase in the biocontrol potential of *Trichoderma parareesei*. *Front Microbiol* 6: 1186.
- Persoon CH.** (1794). Dispositio methodica fungorum in Classes, Ordines, Familias et Genera. En *Neues Magazin für die Botanik* (ed. Römer, JJ), Ziegler und Söhne: Zurich, Alemania. pp. 63-128.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, van der Ent S y van Wees SCM.** (2009). Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308-316.
- Pitzschke A, Schikora A y Hirt H.** (2009). MAPK cascade signaling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12: 421-426.
- Prieto P y Mercado-Blanco.** (2008). Endophytic colonization of olive roots by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 297-306.
- Prieto P, Navarro-Raya C, Valverde-Correrador A, Amyotte SG, Dobinson KF y Mercado-Blanco J.** (2009). Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its *in planta* interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microb Biotechnol* 2: 499-511.
- Pusztahelyi, Holb IJ y Pócsi I.** (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front Plant Sci* 6: 573.
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP y Gu Y.** (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13: 341.
- Raeder U y Broda P.** (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1: 17-20.
- Rahman Z, Shida Y, Furukawa T, Suzuki Y, Okada H, Ogasawara W y Morikawa Y.** (2009). Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular  $\beta$ -glucosidase I. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 1083-1089.
- Rapoport HF.** (2001). Botánica y morfología. En *El cultivo del olivo* 4ª Ed. (eds. Barranco D, Fernández Escobar R y Rallo L), Mundi-Prensa: Madrid, España. pp. 37-60.
- Rauyaree P, Ospina-Giraldo MD, Kang S, Bhat RG, Subbarao KV, Grant SJ y Dobinson KF.** (2005). Mutations in *VMK1*, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. *Curr Genet* 48:109-116.
- Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R y Collado IG.** (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev* 7: 89-123.
- Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, Peissl I, Seidl V, Krska R y Zeilinger S.** (2005). The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet Biol* 42: 749-760.

- Reithner B, Ibarra-Laclette E, Mach RL y Herrera-Estrella A.** (2011). Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. *Appl Environ Microbiol* 77: 4361-4370.
- Rensink WA y Buell CR.** (2005). Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends Plant Sci* 10: 603-609.
- Rifai MA.** (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* 116: 1-56.
- Rocha-Ramírez V, Omero C, Chet I, Horwitz BA y Herrera-Estrella A.** (2002). *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tg1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell* 1: 594-605.
- Rodríguez-Jurado D, Blanco-López MA, Rapoport HF y Jiménez-Díaz RM.** (1993). Present status of Verticillium wilt of olive in Andalucía (southern Spain). *EPPO Bull* 23: 513-516.
- Ron M y Avni A.** (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16: 1604-1615.
- Rosado IV, Rey M, Codon AC, Govantes J, Moreno-Mateos MA y Benítez T.** (2007). QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genet Biol* 44: 950-964.
- Rosgaard L, Pedersen S, Langston J, Akerhielm D, Cherry JR y Meyer AS.** (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. *Biotechnol Prog* 23: 1270-1276.
- Rotblat B, Enshell-Seijffers D, Gershoni JM, Schuster S y Avni A.** (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J* 32: 1049-1055.
- Ruano-Rosa D, Prieto P, Rincón A M, Gómez-Rodríguez MV, Valderrama R, Bautista Barroso J y Mercado-Blanco J.** (2016). Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. *BioControl* 61: 269-282.
- Rubio MB, Cardoza RE, Hermosa R, Gutiérrez S y Monte E.** (2008). Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr Genet* 54: 301-312.
- Rubio MB, Domínguez S, Monte E y Hermosa R.** (2012). Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology* 158: 119-128.
- Rubio MB, Hermosa R, Reino JL, Collado IG y Monte E.** (2009). *Thctf1* transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genet Biol* 46: 17-27.
- Rubio MB, Quijada NM, Pérez E, Domínguez S, Monte E y Hermosa R.** (2014). Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *Appl Environ Microbiol* 80: 1864-1873.
- Ruggieri G.** (1946). Una nuova malattia dell'olivo. *L'Italia Agric* 83: 369-372.
- Ruocco M, Lanzuise S, Vinale F, Marra R, Turrà D, Woo SL y Lorito M.** (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 291-301.

- Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorská R, Beeckman T, Friml J y Benková E.** (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 19: 2197-2212.
- Sadfi-Zouaoui N, Hannachi I, Rouaissi M, Hajlaoui MR, Rubio MB, Monte E, Boudabous A y Hermosa R.** (2009). Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Can J Microbiol* 55: 154-162.
- Sambrook J y Russell D.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH Press: Nueva York, EE.UU. pp. 2028.
- Samolski I, de Luis A, Vizcaíno JA, Monte E y Suárez MB.** (2009). Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiol* 9: 217.
- Samolski I, Rincón AM, Pinzón LM, Viterbo A y Monte E.** (2012). The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158: 129-138.
- Sánchez-Arreguín A, Pérez-Martínez AS y Herrera-Estrella A.** (2012). Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* reveals independent roles for transcription factors BLR-1 and BLR-2 in light and darkness. *Eukaryot Cell* 11: 30-41.
- Sanger F, Coulson AR, Friedmann T, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Fiddes JC, Hutchison CA, Slocombe PM y Smith M.** (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage phiX174. *J Mol Biol* 125: 225-246.
- Santhanam P y Thomma BP.** (2013). *Verticillium dahliae* *Sge1* differentially regulates expression of candidate effector genes. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 249-256.
- Santhanam P, van Esse HP, Albert I, Faino L, Nürnberger T y Thomma BP.** (2013). Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 278-86.
- Sanz L, Montero M, Grondona I, Vizcaíno JA, Llobell A, Hermosa R y Monte E.** (2004). Cell-wall degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr Genet* 46: 277-286.
- Schaible LC, Cannon OS y Waddoups V.** (1951). Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in a tomato cross. *Phytopathology* 41: 986-990.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC y Manners JM.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11655-11660.
- Schilirò E, Ferrara M, Nigro F y Mercado-Blanco J.** (2012). Genetic responses induced in olive roots upon colonization by the biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PLOS ONE* 7: e48646.
- Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Harman GE y Kubicek CP.** (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 60: 4364-4370.
- Schnathorst WC.** (1981). Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. En *Fungal wilt diseases of plants*. (eds. Mace ME, Bell AA y Beckman CH) Academic Press: Nueva York, EE.UU.
- Schnathorst WC y Mathre DE.** (1966). Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. *Phytopathology* 56: 1155-1161.
- Schnathorst WC y Sibbett GS.** (1971). The relation of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum* and *Olea europaea* in California. *Plant Dis Rep* 9: 780-782.

- Schulze A y Downward J. (2001).** Navigating gene expression using microarrays - a technology review. *Nat Cell Biol* 3: 190-195.
- Schuster A, Bruno KS, Collett JR, Baker SE, Seiboth B, Kubicek CP y Schmoll M. (2012).** A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels* 5: 1.
- Segarra G, Casanova E, Avilés M y Trillas I. (2010).** *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microb Ecol* 59: 141-149.
- Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena MA, Oliveira E y Trillas I. (2007).** Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* T34. *Proteomics* 7: 3943-3952.
- Segarra G, van der Ent S, Trillas I y Pieterse CMJ. (2009).** MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol* 11: 90-96.
- Seiboth B, Herold S y Kubicek. (2012).** Metabolic engineering of inducer formation for cellulose and hemicellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Subcell Biochem* 64: 367-390.
- Seiboth B, Karimi RA, Phatale PA, Linke R, Hartl L, Sauer DG, Smith KM, Baker SE, Freitag M y Kubicek CP. (2012).** The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol* 84: 1150-1164.
- Seidl V, Gamauf C, Druzhinina IS, Seiboth B, Hartl L y Kubicek CP. (2008).** The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics* 9: 327.
- Seidl V, Marchetti M, Schandl R, Allmaier G y Kubicek CP. (2006).** Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J* 273: 4346-4359.
- Seidl V, Seibel C, Kubicek CP y Schmoll M. (2009).** Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13909-13914.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP y De Bolle MF. (2008).** Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* 46: 941-950.
- Shimomura O, Johnson FH y Saiga Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239.
- Shoresh M y Harman GE. (2008).** Genome-wide identification, expression and chromosomal location of the genes encoding chitinolytic enzymes in *Zea mays*. *Mol Genet Genom* 280: 173-185.
- Shoresh M, Harman GE y Mastouri F. (2010).** Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48: 21-43.
- Shoresh M, Yedidia I y Chet I. (2005).** Involvement of the jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Shtienberg D y Elad Y. (1997).** Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87: 332-340.
- Sivasithamparam K y Ghisalberti EL. (1998).** Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1) (eds. Kubicek CP y Harman GE), Taylor & Francis: Londres, Reino Unido. pp. 139-191.
- Skinner W, Keon J y Hargreaves J. (2001).** Gene information for fungal plant pathogens from expressed sequences. *Curr Opin Microbiol* 4: 381-386.

- Souza AA, Leitão VO, Ramada MH, Georg RdeC, Ulhôa CJ y de Freitas SM.** (2016). *Trichoderma harzianum* produces a new thermally stable acid phosphatase, with potential for biotechnological application. *PLOS ONE* 11: e0150455.
- Spatafora JW, Sung G-H, Johnson D, Hesse C, O'Rourke B, Serdani M, Spotts R, Lutzoni F, Hofstetter V, Miadlikowska J y col.** (2006) A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia* 98: 1018-1028.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ y Pieterse CM.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760-770.
- Steiger MG, Vitikainen M, Uskonen P, Brunner K, Adam G, Pakula T, Penttilä M, Saloheimo M, Astrid R y Mach-Aigner AR.** (2011). Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Appl Environ Microbiol* 77: 114-121.
- Steindorff AS, Ramada MH, Coelho AS, Miller RN, Pappas GJ Jr, Ulhoa CJ y Noronha EF.** (2014). Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics* 15:204.
- Steyaer JM, Stewart A, Jaspers MV, Carpenter M y Ridgway HJ.** (2004). Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and proteinase (*prb1*) implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. *Mycologia* 96: 1245-1252.
- Stoppacher N, Zeilinger S, Omann M, Lassahn PG, Roitinger A, Krska R y Schuhmacher R.** (2008). Characterisation of the peptaibome of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22: 1889-1898.
- Suárez MB, Rey M, Castillo P, Monte E y Llobell A.** (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 46-55.
- Suárez MB, Sanz L, Chamorro MI, Rey M, Gonzalez FJ, Llobell A y Monte E.** (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet Biol* 42: 924-934.
- Suárez MB, Vizcaíno JA, Llobell A y Monte E.** (2007). Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2412 using the TrichoEST functional genomics approach. *Curr Genet* 51:331-342.
- Sugawara S, S Hishiyama S, Jikumar Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y y Kasahara H.** (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5430-5435.
- Sukno S, García V, Shaw B y Thon M.** (2008). Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotichum graminicola*. *Appl Environ Microbiol* 74: 823-832
- Sun C, Shao Y, Vahabi K, Lu J, Bhattacharya S, Dong S, Yeh KW, Sherameti I, Lou B, Baldwin IT y Oelmüller R.** (2014). The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects *Arabidopsis* from *Verticillium dahliae* infection by downregulation plant defense responses. *BMC Plant Biol* 14: 268.
- Syed NH, Kalyna M, Marquez Y, Barta A y Brown JWS.** (2012). Alternative splicing in plants –coming of age. *Trends Plant Sci* 17: 616-623.
- Taghdi Y, Hermosa R, Domínguez S, Rubio MB, Essalmani H, Nicolás C y Monte E.** (2015). Effectiveness of composts and *Trichoderma* strains for control of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathol Mediterr* 54: 232-240.

- Tang J, Liu L, Huang X, Li Y, Chen Y y Chen J.** (2010). Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* mycelia stressed by organophosphate pesticide dichlorvos. *Can J Microbiol* 56: 121-127.
- Thaler JS, Humphrey PT y Whiteman NK.** (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 17: 260-270.
- Thomma BP, Nürnberger T y Joosten MH.** (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23: 4-15.
- Tijerino A, Cardoza RE, Moraga J, Malmierca MG, Vicente F, Aleu J, Collado IG, Monte E, Gutiérrez S y Hermosa R.** (2011). Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genet Biol* 48: 285-296.
- Timpner C, Braus-Stromeyer SA, Tran VT y Braus GH.** (2013). The Cpc1 regulator of the cross-pathway control of amino acid biosynthesis is required for pathogenicity of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 1312-1324.
- Tjamos EC.** (1993). Prospects and strategies in controlling *Verticillium* wilt of olive. *EPPO Bull* 23: 505-512.
- Tjamos EC y Jiménez-Díaz RM.** (1998). Management of disease. En *A compendium of Verticillium wilt in trees species* (eds. Hiemstra JA, y Harris DC), Ponsen y Looijen: Wageningen, Holanda. pp. 55-57.
- Tran VT, Braus-Stromeyer SA, Kusch H, Reusche M, Kaever A, Kühn A, Valerius O, Landesfeind M, Aßhauer K, Tech M y col.** (2014). *Verticillium* transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plants roots. *New Phytologist* 202: 565-581.
- Trail F, Xu JR, Miguel PS, Halgren RG y Corby Kistler H.** (2003). Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet Biol* 38: 187-197.
- Trapero A y Blanco MA.** (2001). Enfermedades. En *El cultivo del olivo 4ª Ed.* (eds. Barranco D, Fernández Escobar R y Rallo L), Mundi-Prensa: Madrid, España. pp: 497-550.
- Trapero A, Roca LF, Moral J, Trapero C y López-Escudero FJ.** (2011). Las enfermedades y su manejo en el olivar ecológico. En *El olivar ecológico.* (eds. Junta de Andalucía y Mundi prensa) Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 203-250.
- Tsuda K y Katagiri F.** (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 13: 459-465.
- Tucci M, Ruocco M, De Masi L, De Palma M y Lorito M.** (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol Plant Pathol* 12: 341-354.
- Tusher VG, Tibshirani R y Chu G.** (2001). Significance analysis of *microarrays* applied to the ionizing radiation response *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5116-5121.
- Tzima AK, Paplomatas EJ, Rauyaree P y Kang S.** (2010). Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet Biol* 47: 406-415.
- Tzima AK, Paplomatas EJ, Rauyaree P, Ospina-Giraldo MD y Kang S.** (2011). *VdsNF1*, the sucrose nonfermenting protein kinase gene of *Verticillium dahliae*, is required for virulence and expression of genes involved in cell-wall degradation. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 129-142.
- Usami T, Itoh M y Amemiya Y.** (2009). Mating type gene *MAT1-2-1* is common among Japanese isolates of *Verticillium dahliae*. *Physiol Mol Plant Pathol* 73: 133-137.
- Vadassery J, Ranf S, Drzewiecki C, Mithöfer A, Mazars C, Scheel D y Oelmüller R.** (2009). A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth

of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *Plant J* 59: 193-206.

**Van der Biezen EA y Jones JDG.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 12: 454-456.

**Van Zeijl CM, van de Kamp EH, Punt PJ, Selten GC, Hauer B, van Gorcom RF y van den Hondel CA.** (1998). An improved colony-PCR method for filamentous fungi for amplification of PCR-fragments of several kilobases. *J Biotechnol* 59: 221-224.

**Vargas WA, Mandawe JC y Kenerley CM.** (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol* 151: 792-808.

**Vargas W, Mukherjee PK, Laughlin D, Wiest A, Morán-Diez ME y Kenerley CM.** (2014). Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiology* 160: 2319-2330.

**Venugopal SC, Jeong RD, Mandal MK, Zhu S, Chandra-Shekara AC, Xia Y, Hersh M, Stromberg AJ, Navarre D, Kachroo A y Kachroo P.** (2009). Enhanced disease susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling. *PLOS Genet* 5: e1000545.

**Vieira PM, Coehlo AS, Steindorff AS, De Siqueira SJ, Silva Rdo N y Ulhoa CJ.** (2013). Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. *BMC Genomics* 14: 177.

**Vinale F, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Marra R, Ritieni A, Ferracane R, Woo S y Lorito M.** (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol* 48: 705-711.

**Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL y Lorito M.** (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol Biochem* 40: 1-10.

**Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Ruocco M, Woo S y Lorito M.** (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat Prod Commun* 7: 1545-1550.

**Viterbo A, Haran S, Friesem D, Ramot O y Chet I.** (2001). Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiol Lett* 200: 169-174.

**Viterbo A, Landau U, Kim S, Chernin L y Chet I.** (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett* 305: 42-48.

**Viterbo A, Montero M, Ramot O, Friesem D, Monte E, Llobell A y Chet I.** (2002). Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr Genet* 42: 114-122.

**Viterbo A, Wiest A, Brotman Y, Chet I y Kenerley C.** (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Mol Plant Pathol* 8: 737-746.

**Vitullo D, Altieri R, Esposito A, Nigro F, Ferrara M, Alfano G, Ranalli G, Cicco V y Lima G.** (2013). Suppressive biomasses and antagonist bacteria for an eco-compatible control of *Verticillium dahliae* on nursery-grown olive plants. *Int J Env Sci Technol* 10: 209-220.

**Vizcaíno JA, Cardoza RE, Hauser M, Hermosa R, Rey M, Llobell A, Becker JM, Gutiérrez S y Monte E.** (2006a). *ThPTR2*, a di/tri-peptide transporter gene from *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genet Biol* 43: 234-246.

- Vizcaíno JA, González FJ, Suárez MB, Redondo J, Heinrich J, Delgado-Jarana J, Hermosa R, Gutiérrez S, Monte E, Llobell A y Rey M.** (2006b). Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genom* 7: 193.
- Vizcaíno JA, Redondo J, Suárez MB, Cardoza RE, Hermosa MR, González FJ, Rey M y Monte E.** (2007). Generation, annotation and analysis of ESTs from for different *Trichoderma* strain grown under condition related to biocontrol. *Appl Microbiol Biotech* 75: 853-862.
- Vizcaíno JA, Sanz L, Basilio A, Vicente F, Gutiérrez S, Hermosa MR y Monte E.** (2005). Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycol Res* 109: 1397-1406.
- Velázquez-Robledo R, Contreras-Cornejo H, Macías-Rodríguez LI, Hernández-Morales A, Aguirre J, Casa-Flores S, López-Bucio J y Herrera-Estrella A.** (2011) Role of the 4-phosphopantetheinyltransferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism, and induction of plant defense responses. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1459-1471.
- Vogt T.** (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* 3: 2-20.
- Wang BB y Brendel V.** (2006). Molecular characterization and phylogeny of U2AF<sup>35</sup> homologs in plants. *Plant Physiol* 140: 624-636.
- Wang Z, Fang B, Chen J, Zhang X, Luo Z, Huang L, Chen X y Li Y.** (2010). De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina pairedend sequencing and development of cSSR markers in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *BMC Genomics* 11:726.
- Webster J.** (1980). Introduction to Fungi, 2ª Ed., Cambridge University Press: Cambridge, Reino Unido.
- White J, Amos W y Forham M.** (1987). An evaluation of confocal versus convencional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol* 105: 41-48.
- Wilhelm S.** (1955). Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45: 180-181.
- Wilhelm S y Taylor JB.** (1965). Control of Verticillium wilt of olive through natural recovery and resistance. *Phytopathology* 55: 310-316.
- Wilhite SE, Lumsden RD y Straney DC.** (2001). Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol* 67: 5055-5062.
- Woo SL y Lorito M.** (2006). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. En *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management*. (eds. Vurro M y Gressel J), Springer: Amsterdam, Holanda. pp. 107-130.
- Woo SL, Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Lanzuise S, Manganiello G y Lorito M.** (2014) *Trichoderma*-based products and their widespread use in agricultura. *Open Mycol J* 8: 71-126.
- Yang HH, Yang SL, Peng KC, Lo CT y Liu SY.** (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycol Res* 113: 924-932.
- Yedidia I, Benhamou N y Chet I.** (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1061-1070.
- Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y y Chet I.** (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235: 235-242.
- Zamioudis C y Pieterse CM.** (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 139-150.
- Zare R, Gams W, Starink-Willemse M y Summerbell RC.** (2007). *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musciellium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85: 463-483.

**Zeilinger S.** (2004). Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr Genet* 45: 54-60.

**Zeilinger S, Reithner B, Scala V, Peissl I, Lorito M y Mach RL.** (2005). Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1591-1597.

**Zhang J, Bayram Akcapinar G, Atanasova L, Rahimi MJ, Przylucka A, Yang D, Kubicek CP, Zhang R, Shen Q y Druzhinina IS.** (2016). The neutral metallopeptidase NMP1 of *Trichoderma guizhouense* is required for mycotrophy and self-defence. *Environ Microbiol* 18: 580-597.

**Zhang N, Castlebury LA, Miller AN, Huhndorf SM, Schoch CL, Seifert KA, Rossman AY, Rogers JD, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, y col.** (2006). An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* 98: 1076-1087.

**Zhou BJ, Jia PS, Gao F y Guo HS.** (2012). Molecular characterization and functional analysis of a necrosis- and ethylene-inducing, protein-encoding gene family from *V. dahliae*. *Mol Plant Microbe Interac* 25: 964-975.