

UCH-FC
DOC-B
1967

C.A.

FACTORES INVOLUCRADOS EN LA ADHESION Y GERMINACION
DE FIALOCONIDIAS DE *Trichoderma harzianum*

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Gastón Arturo Muñoz Vera

Noviembre de 1995

Director de Tesis : Dr. Eduardo Agosin Trumper

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

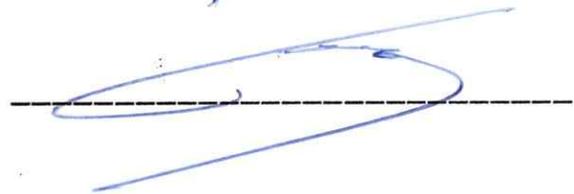
Se informa a la comisión de postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

GASTON ARTURO MUÑOZ VERA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de la tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 8 de Noviembre de 1995.

Director de Tesis :

Dr. Eduardo Agosin Trumper



Comisión de Evaluación de la Tesis :

Dra. Rosalba Lagos



Dra. Luz María Perez



Dra. Liliana Cardemil



Dr. Victor Cifuentes



Con cariño para Juany, Gerardo y Andrés

AGRADECIMIENTOS

La finalización de una Tesis de Doctorado es producto del esfuerzo y sacrificio personal. Sin embargo, no hubiera podido llegar a buen término sin la colaboración de muchas personas a quienes quisiera agradecer.

A Eduardo Agosin por acojarme desde mi salida del pregrado y enseñarme su personal visión de la investigación.

Al gran grupo humano que ha transitado por el laboratorio, desde sus inicios hasta la actualidad, y con quienes siempre se ha logrado crear un grato ambiente. En especial a mis amigos: Herman, Rojitas, Milena, Spiegel, Juan Scarpa, Daniel y Lenka.

Al grupo verde de biopesticidas del Proyecto Fondef AI-21 dirigido por Ricardo San Martín por la interacción y apoyo. En especial a Rodrigo, Ximena, Dorian, Franco, Paula, Laura y Mark.

También agradezco a CONICYT que mediante el proyecto 2940004 financió parte de este trabajo.

A Merja Penttilä por su desinteresada acogida, apoyo e interacción. En especial quienes me ayudaron en Finlandia: Emilio Magolles, Tiina Nakari, Marja Ilmén, Markku Saloheimo, Nina Aro, Seija Nordberg y Adelina Orellana.

Finalmente, a mi familia por su permante apoyo, cariño y preocupación. Muy especialmente a quienes dedico este trabajo. Mi esposa, por ser tremendamente comprensiva, cariñosa y facilitarme las cosas. Sin su ayuda gran parte de esto no hubiera sido posible. Gracias Juany. A mis hijos Gerardo y Andrés por su amor incondicional, alegría e inocencia.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE FIGURAS	xii
INDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xix
ABREVIATURAS	xxii
1. INTRODUCCION	1
1.1. Control Biológico	1
1.2. <i>Trichoderma harzianum</i> como agente de control biológico	2
1.3. Producción de <i>T. harzianum</i> . como biopesticida	4
1.4. Factores que inciden sobre la efectividad de biopesticidas	7
1.5. Características de las esporas fúngicas no germinantes	8
1.5.1. Estado de latencia de las esporas	8
1.5.2. Rol de la pared y componentes de superficie de la espora	9
1.6. Hidrofobinas	10
1.6.1. Rol de las hidrofobinas	12

1.6.2. Hidrofobinas en <i>Trichoderma</i>	15
1.7. Activación de la espora latente	18
1.7.1. Efecto de nutrientes	19
1.7.2. Mecanismo de la activación	20
1.8. Germinación de esporas fúngicas	21
1.8.1. Establecimiento de la actividad metabólica	22
1.8.2. Rol de aminoácidos y metabolismo del nitrógeno	23
1.8.3. Germinación en <i>Trichoderma</i>	27
1.9. Presentación del trabajo	28
1.9.1. Objetivo general	28
1.9.2. Hipótesis de trabajo	29
1.9.3. Objetivos específicos	29
2. MATERIALES Y METODOS	31
2.1. Reactivos químicos	31
2.2. Microorganismos	31
2.3. Medios de cultivo	32
2.3.1. Medio para producir esporas aéreas	32
2.3.2. Medio para producir esporas sumergidas	32
2.2.3. Medio de germinación (MG)	33
2.4. Condiciones de cultivo	33

2.5. Obtención de esporas	34
2.5.1. Obtención de esporas aéreas de <i>T. harzianum</i>	34
2.5.2. Obtención de esporas aéreas de <i>T. reesei</i>	34
2.5.3. Obtención de esporas sumergidas de <i>T. harzianum</i>	35
2.5.4. Obtención de esporas germinadas de <i>T. harzianum</i>	35
2.6. Obtención de micelio aéreo vegetativo y esporulante de <i>T. harzianum</i> .	36
2.7. Determinación del índice de germinación y captación del colorante azul de lactofenol	37
2.8. Determinación del consumo de oxígeno	37
2.9. Determinación de captación e incorporación de leucina radiactiva	38
2.10. Análisis mediante técnicas de microscopía electrónica	39
2.10.1. Colecta y fijación de las muestras	39
2.10.2. Análisis por microscopía de barrido	40
2.10.3. Análisis por microscopía de transmisión	40
2.10.4. Técnica de replicas mediante sombreado	41
2.11. Determinación de aminoácidos	41
2.11.1. Extracción de las muestras	41
2.11.2. Obtención de la fracción aminoácidica	42
2.11.3. Determinación de aminoácidos mediante HPLC	42
2.12. Análisis de Trehalosa	43

2.13. Ensayos de actividades enzimáticas	44
2.13.1. Obtención de extractos enzimáticos crudos	44
2.13.2. Determinación de actividad de glutamina sintetasa	44
2.13.3. Determinación de la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP	45
2.13.4. Determinación de la actividad glutamato sintasa dependiente de NADH	46
2.14. Análisis de propiedades funcionales de las esporas	46
2.14.1. Evaluación de la longevidad	46
2.14.2. Resistencia a la radiación ultravioleta	47
2.14.3. Ensayo de hidrofobicidad de las esporas	47
2.15. Extracción de proteínas asociadas a la pared de las esporas aéreas	48
2.16. Extracción de las proteínas presentes en los medios de cultivo líquidos	49
2.17. Extracción de proteínas de micelio aéreo no esporulante	49
2.18. Análisis electroforético de las proteínas bajo condiciones desnaturantes (SDS-PAGE)	50
2.19. Detección de proteínas mediante la técnica de Western	41
2.20. Cuantificación de proteínas	52
2.21 Análisis de ácidos nucleicos de <i>T. harzianum</i>	52
2.21.1. Análisis de DNA	52
2.21.1.a. Purificación de DNA genómico	52

2.21.1.b. Cuantificación del DNA	53
2.21.1.c. Análisis mediante la técnica de Southern	54
2.21.1. Análisis de RNA	55
2.21.1.a. Purificación de RNA total	55
2.21.1.b. Cuantificación del RNA	56
2.21.1.c. Análisis mediante la técnica de Northern	56
2.22. Obtención de sondas marcadas con ^{32}P .	57
2.23. Clonamiento de hidrofobinas de <i>T. harzianum</i> expresadas durante la esporulación.	58
2.23.1. Construcción de genoteca de cDNA	58
2.23.2. Selección y purificación de clones	59
3. RESULTADOS	61
3.1. Caracterización de factores relacionados con la adhesión de las esporas aéreas de <i>T. harzianum</i>	61
3.1.1. Caracterización de la conidiogénesis aérea	61
3.1.1.a. Inducción de la esporulación	61
3.1.1.b. Evolución morfológica durante la esporulación	61
3.1.2. Comparación morfológica entre las esporas aéreas y sumergidas	65
3.1.2. a. Análisis de microscopia de barrido	65
3.1.2.b. Análisis por microscopia de transmisión	66
3.1.2.c. Características funcionales	68

3.1.2.d. Características bioquímicas	68
3.1.4. Naturaleza de los factores responsables del carácter hidrofóbicos de las esporas aéreas.	71
3.1.4.a. Efecto de la solubilización de componentes de la pared de la espóra	71
3.1.4.b. Presencia de estructuras tipo rodlets en la superficie de las esporas aéreas de <i>T. harzianum</i> .	73
3.1.5. Detección de proteínas tipo hidrofobinas en las esporas aéreas de <i>T. harzianum</i>	74
3.1.5.a. Caracterización de la extracción de P18, P10 y P8	76
3.1.5.b. Presencia de P18, P10 y P8 en las esporas sumergidas	79
3.1.6. Clonamiento de hidrofobinas expresadas durante la esporulación	79
3.1.6.a. Construcción de una genoteca de cDNA	79
3.1.6.b. Selección y purificación de los clones	81
3.1.7. Regulación de la expresión del gen de <i>T. harzianum</i> homólogo a <i>hfb2</i>	84
3.1.7.a. Expresión bajo condiciones de esporulación	84
3.1.7.b. Efecto de la limitación de nutrientes sobre la expresión del gen homólogo a <i>hfb2</i>	86
3.2. Caracterización de las condiciones que activan la germinación de las esporas aéreas	90

3.2.1 . Requerimientos para la germinación de las esporas aéreas.	90
3.2.1. a. Factores abióticos.	90
3.2.1.b. Efecto de nutrientes	92
3.2.2. Cambios morfológicos durante la germinación	95
3.2.3. Activación metabólica durante la germinación	99
3.2.3.a. Actividad respiratoria	99
3.2.3.b. Síntesis de proteína	99
3.2.4. Metabolismo del nitrógeno durante la germinación	102
3.2.4.a. Niveles de aminoácidos libres en las esporas de <i>T. harzianum</i>	102
3.2.4.b. Evolución de los niveles de glutamina y glutamato durante la germinación	105
3.2.4.c. Enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno durante la germinación	107
3.2.4.c. Efecto de las condiciones de germinación sobre la actividad fisiológica de glutamina sintetasa	109
4. DISCUSION	111
5. PROYECCIONES	133
6. CONCLUSIONES	134
7. REFERENCIAS	136

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida para <i>Trichoderma harzianum</i>	4
Figura 2. Comparación de los perfiles hidropáticos de las hidrofobinas	11
Figura 3. Modelo propuesto para la formación de los rodlets en <i>Schizophyllum commune</i>	13
Figura 4. Alineación de las secuencias aminoacídicas de las hidrofobinas de clase II.	17
Figura 5. Esquema de los primeros eventos metabólicos desarrollados durante la germinación de esporas de <i>Neurospora crassa</i>	24
Figura 6. Esquema propuesto para el metabolismo del nitrógeno en <i>N. crassa</i>	26
Figura 7. Desarrollo de la esporulación de la cepa P1 de <i>T. harzianum</i> en el medio AMLI	62
Figura 8. Evolución ultraestructural observada durante la esporulación aérea de <i>T. harzianum</i>	64
Figura 9. Aspecto de las esporas aéreas y sumergidas mediante microscopía electrónica	67
Figura 10. Evaluación de la hidrofobicidad de las esporas de <i>T. harzianum</i>	70

Figura 11. Análisis electroforético de las proteínas totales de las esporas aéreas y sumergidas	72
Figura 12. Extracción de las putativas hidrofobinas de las esporas aéreas de <i>T. harzianum</i>	75
Figura 13. Efecto de diferentes condiciones de extracción sobre la solubilización de P18, P10 y P8 de esporas aéreas de <i>T. harziaum</i> .	77
Figura 14. Determinación de dos fracciones de proteínas tipo hidrofobinas diferentemente asociadas a las esporas aéreas de <i>T. harzianum</i>	78
Figura 15. Caracterización de la esporulación de <i>T. harzianum</i> en medios líquidos	80
Figura 16. Determinación de genes en <i>T. harzianum</i> homólogos a <i>hfb2</i> .	83
Figura 17. Análisis del tamaño de inserto de los clones seleccionados, homólogos a <i>hfb2</i> .	85
Figura 18. Expresión del gen homólogo a <i>hfb2</i> durante el crecimiento aéreo de <i>T. harzianum</i> , bajo condiciones vegetativas y de esporulación.	87
Figura 19. Efecto de la limitación de nutrientes sobre la expresión en <i>T. harzianum</i> del gen homologo a <i>hfb2</i>	89
Figura 20. Cambios ultraestructurales durante la germinación de esporas de <i>T. harzianum</i> .	97
Figura 21. Cambios morfológicos y metabólicos durante la germinación de esporas de <i>T. harzianum</i> bajo condiciones óptimas	69
Figura 22. Evolución de la germinación de las esporas de <i>T. harzianum</i> en MMG.	100

Figura 23. Efecto de cicloheximida sobre la incorporación y captación de [C14]leucina durante la germinación de esporas de <i>T. harzianum</i>	101
Figura 24. Efecto de los nutrientes sobre la incorporación de [C14]leucina en esporas de <i>T. harzianum</i> .	103
Figura 25. Metabolismo de compuestos nitrogenados durante la germinación de esporas de <i>T. harzianum</i>	106
Figura 26. Efecto de las condiciones nutricionales sobre la actividad <i>in vivo</i> de glutamina sintetasa durante la germinación de esporas de <i>T. harzianum</i> .	110
Figura 27. Resumen esquemático del comportamiento de las esporas de <i>T. harzianum</i> durante su estado de latencia, inducción y desarrollo de la germinación.	132

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de la forma de producción de esporas de <i>T. harzianum</i> sobre el grado de infección de uva de mesa con <i>Botrytis cinerea</i>	6
Tabla 2. Características de los diferentes estados de la esporulación aérea de <i>T. harzianum</i>	63
Tabla 3. Propiedades de las esporas de <i>T. harzianum</i> producidas por micelio aéreo y sumergido.	69
Tabla 4. Valores óptimos encontrados para varios parámetros que inciden en la germinación de esporas aéreas de <i>T. harzianum</i> .	91
Tabla 5. Efecto de fuentes de nitrógeno sobre la germinación de esporas aéreas de <i>T. harzianum</i>	94
Tabla 6. Contenido de aminoácidos endógenos libres en esporas de <i>T. harzianum</i> , con diferentes estados germinativo	104
Tabla 7. Actividad específica de enzimas involucradas en la asimilación del nitrógeno durante la germinación y crecimiento de <i>T. harziaum</i> .	108

RESUMEN

Las esporas asexuales del micoparásito *Trichoderma harzianum* (fialoconidias) están siendo utilizadas como biopesticidas. Las esporas pueden producirse mediante dos modalidades: cultivo líquido (esporas sumergidas) y cultivo sobre sustrato sólido (esporas aéreas). Estas últimas parecieran comportarse mejor, en el campo, como agente de biocontrol. Para un eficiente accionar en el filoplano, el biopesticida debe en primer lugar adherirse a la superficie de frutos y hojas, las que generalmente son hidrofóbicas. Luego de resistir las condiciones ambientales adversas, la spora deberá desarrollar una efectiva germinación, debido a que solo en el estado vegetativo se expresa el antagonismo. En este trabajo, se evaluaron los atributos como agente de biocontrol de las esporas de *T. harzianum* producidas bajo diferentes modalidades de cultivo. El trabajo se centró en la determinación de los factores involucrados en la adhesión y como se desencadena la germinación.

La comparación morfológica, bioquímica y funcional entre las esporas aéreas y sumergidas mostró notables diferencias entre ambas células. Particularmente, las esporas aéreas fueron más longevas y resistentes. Esto podría relacionarse con el estado latente en que aparentemente son producidas. A éste respecto, el grosor de

la pared externa pareciera ser importante. En efecto, tal pared es específica de la espora y notablemente más gruesa en las aéreas.

Otra característica diferencial entre ambas esporas fue el carácter hidrofóbico de las esporas aéreas, mientras que las sumergidas fueron hidrofílicas. La hidrofobicidad se relacionó con componentes de la pared externa, lo que llevó a sospechar la presencia de proteínas tipo hidrofobinas en la superficie de las esporas aéreas. Entre las proteínas asociadas con la pared externa de las esporas aéreas de *T. harzianum*, se detectaron al menos 3 proteínas (18, 10 y 8 kDa) inmunológicamente relacionadas con HFBI, una hidrofobina de clase II de *Trichoderma reesei*. Estas proteínas presentaron características de solubilidad similares a otras hidrofobinas de clase II y se encontrarían en la espora bajo dos formas. Una fracción estaría debilmente asociada con la pared, siendo extraídas con agua y soluciones acuosas de mediana polaridad. La segunda fracción solo se extrae de las esporas aéreas con tratamientos más fuertes, como SDS al 1% caliente, indicando una interacción más estrecha con la espora. Debido a que las extracciones que solubilizan la primera fracción también disminuyen la hidrofobicidad de las esporas aéreas, sugiere que las putativas hidrofobinas identificadas estarían involucradas en el carácter hidrofóbico. Estas proteínas no fueron detectadas en las esporas sumergidas, pero se acumularon en el medio de cultivo, concomitante al incremento del número de esporas. Esto sugiere que bajo condiciones de cultivo líquido se estarían perdiendo

componentes de la pared externa hacia el medio de cultivo. Tal hecho, disminuiría el grosor de la pared externa, lo que a su vez, facilitaría la interacción de la espora con el medio ambiente activando el metabolismo, lo que podría afectar la viabilidad celular a través de reacciones de deterioro.

Para identificar fehacientemente la presencia de hidrofobinas en las esporas de *T. harzianum*, se aislaron genes de este tipo que se estuvieran expresando durante la esporulación. Para esto, se realizó una genoteca de cDNA en λ ZAP a partir de los RNAm presentes en cultivos esporulantes. Mediante hibridización heteróloga, usando el gen *hfb2* que corresponde a la hidrofobina ligada a la espora de *T. reesei*, se aislaron 12 clones. Los resultados de los análisis mediante las técnicas de Southern, bajo distinto grado de estrictez, indican que en *T. harzianum* existiría más de un gen homólogo a *hfb2*. Sin embargo, los resultados mediante la técnica de Northern usando uno de los clones aislados como sonda, indica que durante la esporulación se expresaría solamente uno. La secuenciación de los clones y su comparación con las otras hidrofobinas está aún en desarrollo.

Debido a la hidrofobicidad, las esporas aéreas debieron ser mecánicamente disgregadas para obtener suspensiones homogéneas, previo a las incubaciones para estudiar la germinación. Tal manipulación podría considerarse una activación de la espora. Esto facilitaría la entrada de agua y nutrientes, desencadenando los

eventos germinativos. Las esporas aéreas ocuparon un largo lapso de tiempo para germinar (12 h). Requirieron de la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno, exceso de agua libre, temperaturas moderadas y pH ácido. El quiebre de la latencia de las esporas implicaría una larga y compleja adaptación ultraestructural para establecer una célula activa. Esto fue evidenciado mediante análisis de microscopía de transmisión electrónica y por el lento desarrollo de actividad metabólica, como respiración, durante la germinación.

La lenta germinación de *T. harzianum* podría relacionarse, además, con la escasa cantidad de compuestos endógenos almacenados en las esporas. A este respecto, el establecimiento de la vía de asimilación de compuestos nitrogenados mostró ser importante. De hecho, la mejor condición nutricional germinativa fue peptona; los estudios de captación de aminoácidos marcados mostró una alta demanda por tales compuestos durante la germinación; los niveles de aminoácidos endógenos libres fueron bajos comparado con esporas de hongos que germinan rápido. Además, una de las actividades tempranas de la germinación fue la síntesis de glutamina a partir de glutamato. Este último aminoácido representa el principal aminoácido almacenado y su transformación evidenció actividad de glutamina sintetasa. Esta enzima se encontró preservada en la spora no germinante y estaría asociada con la fracción microsomal. Esta particular preservación, descrita en este trabajo por primera vez, resalta la necesidad e importancia para la spora de establecer esta vía metabólica. La sola incubación de las

esporas en agua fue suficiente para que se desarrollara la síntesis de glutamina. Esto indica que tal actividad no sería dependiente de la presencia de nutrientes exógenos para activarse y comprueba el hecho que condiciones que no sustentan la germinación morfológica pueden desencadenar eventos de la misma.

Los resultados obtenidos indican que las esporas aéreas serían más resistentes que las sumergidas y su hidrofobicidad favorecería su dispersión aérea, adhesión a sustratos, no requiriendo formulaciones sofisticadas para tales fines. La información obtenida con respecto a la modalidad de germinación, será de utilidad para el desarrollo de formulaciones de preparados de esporas con alta germinabilidad y permitirá predecir el comportamiento germinativo de las esporas en terreno.

ABSTRACT

Asexual spores of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* (phialoconidia) are employed in biocontrol programmes. Its spores can be produced either by submerged or solid substrate cultivation techniques, obtaining submerged and aerial spores, respectively. The latter spores have showed better behaviour as a biocontrol agent in the field. On the phylloplane, before expressing their antagonistic activity, spores must develop a rapid and effective adhesion to leaves and other hydrophobic surfaces. Then they must be able to survive in the environment and finally activate the germination process. In this work, important characteristics for a biocontrol agent were evaluated in *T. harzianum* spores produced by the two cultivation techniques. In particular, factors involved in adhesion and triggering of germination were studied.

Morphologically, biochemically and functionally, aerial spores were significantly different from those obtained by submerged cultivation. Aerial spores had greater longevity and were more resistant than submerged ones. The latter may be related to its dormant state. Outer wall thickness seems to be critical in the preservation of the integrity of whole spore. Indeed, this layer is spore specific and is nearly twice the thickness of submerged ones.

Hydrophobicity was the other noticeable difference between aerial and submerged spores. This property was related to components on the aerial spore surface, suggesting that hydrophobins may be involved. On analysis, three proteins (18, 10 and 8 kDa) extracted from spore walls and reacting with HFB1 antisera, a class II hydrophobin from *Trichoderma reesei*, were found. These proteins showed similar solubility properties to other class II hydrophobins and were associated with two fractions on the spore wall. One form has a weak association with the spore wall and can be extracted with water and apolar aqueous solutions. The second form can be extracted only with a strong treatment such as hot 1% SDS. Considering that the hydrophobicity is lost along with the first fraction, an involvement of the putative hydrophobins identified with hydrophobicity is implicated. These proteins were absent from submerged spores, but accumulated in the extracellular liquid, concomitant with spore production. Therefore, under liquid culture conditions, outer wall components are being released, decreasing wall thickness and facilitating subsequent spore interactions with the environment. Under these conditions, viability might be affected by deleterious reactions.

To identify hydrophobins on aerial spores of *T. harzianum*, hydrophobin-related genes expressed under sporulating conditions were isolated. For this purpose, a cDNA bank was constructed from mRNA present in sporulating cultures, in phage λ ZAP vector. By heterologous hybridizations using *hfb2* (the spore-bound

hydrophobin gene of *T. reesei*), as a probe, 12 clones were isolated. The results of Southern analyses, carried out under different stringencies, indicate that there is more than one *hfb2* homologous gene in *T. harzianum*. However, only one of them is expressed under sporulating conditions, as indicated by Northern analyses using ones of the selected clones as a probe. Sequencing of the clones obtained and data comparisons with identified hydrophobins are now under progress.

Due to their hydrophobicity, mechanical suspension of aerial spores was an obligatory step in germination experiments. This manipulation can be considered as an activation, allowing quick water and nutrient uptake, thereby triggering germination events. Germination of *T. harzianum* spores was a slow process. A time of 12 h, presence of carbon and nitrogen sources, a moderate temperature, high levels of free water and acidic pH were required for completion. Loss of the dormancy state seems to involve a long and complex ultrastructural transformation allowing the establishment of an actively growing cell. The latter was supported by TEM analysis and by the late metabolic activity development, such as respiration.

Moreover, the slow germination of *T. harzianum* could be related to the limited availability of endogenous compounds stored in spores. In this respect, the establishment of nitrogen assimilation pathway appears to be important. Several facts support this

assumption: peptone was the best nutritional germinating condition; spores showed increased radiolabeled aminoacid uptake; free endogenous aminoacid levels were lower in *T. harzianum* spores than other quicker germinating fungal spores. Moreover, glutamine synthesis from glutamate was an early event. The later was the major stored aminoacid and its transformation indicates glutamine synthetase activity. The later enzyme was preserved in non-germinating spores and was associated with the microsomal fraction. This is the first report of this enzyme in spores and it indicates the importance of the nitrogen assimilation pathway to *Trichoderma* germination. Glutamine synthesis was detected when spores were incubated only in water, indicating that this enzyme is not nutrient-activated. Moreover, this shows that some germinating events can be activated by non-support germination conditions.

In conclusion, aerial spores have attributes that better enable them to resist environmental conditions. Hydrophobicity might facilitate air dispersion and substrate adhesion, thereby eliminating the need for include them in sophisticated formulations for biocontrol purposes. Germination data will be useful in the design of formulation that give high spore germinability, and in predicting spore behaviour in the field.

ABREVIATURAS

AML:	Agar malta levadura
AMLI:	Agar malta levadura igepal
ACN/TFA:	Solución de acetonitrilo/ácido trifluoroacético (20%/0.1%)
BSA:	Albúmina de suero de bovino
cDNA:	DNA complementario
DNA:	Acido desoxirribonucleico.
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético
<i>hfb2</i> :	Gen que codifica para la hidrofobina HFB2 de <i>Trichoderma reesei</i> .
GDH:	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP
GOGAT:	Glutamato sintasa
GS:	Glutamina sintetasa
IPTG:	Isopropilo- β -galactosido
LSB:	Laemli's sample buffer (Amortiguador de carga para las muestras de proteínas analizadas electroforeticamente)
MG:	Medio de germinación
MML:	Medio malta-levadura
MLE:	Medio líquido de esporulación
MMG:	Medio mínimo de germinación

RNA:	Acido ribonucleico
RNA _m :	RNA mensajero
RNA _{poli(A)} ⁺ :	RNA poliadenilado
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforésis de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalantes
TCA:	Acido tricloroacetico
TFA:	Acido Trifluoroacetico
UV:	Luz ultravioleta (253 nm)
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido

1. INTRODUCCION

1.1. Control biológico.

La utilización de pesticidas químicos en la agricultura moderna ha provocado la contaminación del ambiente y desarrollo de resistencia en las plagas a controlar. Una atractiva alternativa para eliminar o reducir el uso de agroquímicos lo constituye el control biológico, biocontrol o uso de biopesticidas. En este sistema el principio activo lo conforma un microorganismo o algún componente derivado (Lisansky, 1989; Lewis y Papavizas, 1991).

El enfoque más utilizado en el biocontrol ha sido el uso de microorganismos que de algún modo antagonicen al fitopatógeno. Los mecanismos involucrados en tal actividad son de diversa índole. Entre éstos se encuentra: 1. Antibiosis o producción de antibióticos tanto volátiles como no volátiles. 2. Micoparasitismo, en donde el reconocimiento del patógeno y producción de enzimas degradativas de la pared fúngica (β -1,3-glucanasas, quitinasas y proteasas) serían importantes. 3. Eficiente utilización de los nutrientes. Esto permite desplazar al patógeno por competencia. 4. Cabe la posibilidad de inducir resistencia en la planta huésped por reacción cruzada con los sistemas defensivos de la misma (Goldman y cols., 1994; Lewis y Papavizas, 1991; Eveleigh, 1985).

En forma general, los agentes de biocontrol deben cumplir con ciertos requisitos como facilidad de preparación y aplicación, además de mantenerse estables durante el transporte y almacenamiento. Para lograr un uso masivo y efectivo de biopesticidas, se requiere de mejoramientos tanto sobre el agente, como también en los métodos de producción y aplicación (Goldman y cols., 1994; Lewis y Papavizas, 1991).

1.2. *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico.

El género *Trichoderma* representa a un grupo de hongos filamentosos de la clase Deuteromicetes. Se les ubica a nivel de suelos donde actúan como saprófitos. Notablemente, varias especies pertenecientes a este género han mostrado un antagonismo contra hongos fitopatógenos (Eveleigh, 1985).

Taxonomicamente, *Trichoderma harzianum* es el estado imperfecto o asexual (anamorfo) de la especie *Hypocrea vinosa* (Eveleigh, 1985). Esta especie, a través de su capacidad micoparasítica y antibiosis, puede controlar una amplia gama de fitopatógenos (Eveleigh, 1985; Goldman y cols., 1994; Bélanger y cols., 1995). Entre estos últimos, se encuentra *Botrytis cinerea* importante fitopatógeno en Chile, agente causal de la pudrición gris de la uva (Auger, 1983). Lo anterior ha hecho que este hongo se utilice comercialmente como agente de biocontrol.

Dentro del ciclo de vida de *T. harzianum* se distinguen cuatro etapas fisiológicas significativas. Estas son: la fase de latencia, germinación, multiplicación vegetativa y conidiogénesis o esporulación (Figura 1; Eveleigh, 1985; Dahlberg y Van Etten, 1982). A partir de estas etapas se pueden originar al menos tres tipos de propágulos con potencial de aplicación en control biológico: micelio (hifas o células vegetativas) y dos tipos de esporas asexuales, fialoconidias y clamidosporas.

Las fialoconidias, debido a la relativa facilidad de producción en altas cantidades, constituyen el propágulo más apropiado para la producción de *T. harzianum* como biopesticida. La formal denominación de las esporas del género de *Trichoderma* como fialoconidias es debido a la forma de botella estilizada -fiálide- de la célula progenitora (ver Figura 1; Eveleigh, 1985).

1.3. Producción de *T. harzianum* como biopesticida.

Para obtener las esporas convencionalmente se ha utilizado la modalidad de cultivo líquido. Esto, debido al gran desarrollo de las tecnologías implicadas en cuanto a su facilidad de control, operación y escalamiento (Lewis y Papavizas, 1991; Papavizas, 1985). Las esporas resultantes, han presentado problemas de resistencia frente a las etapas post-productivas como secado y almacenamiento (Lewis y Papavizas, 1991; Harman y cols., 1991; Agosin y cols., 1995). La manipulación de ciertos parámetros, como la actividad de

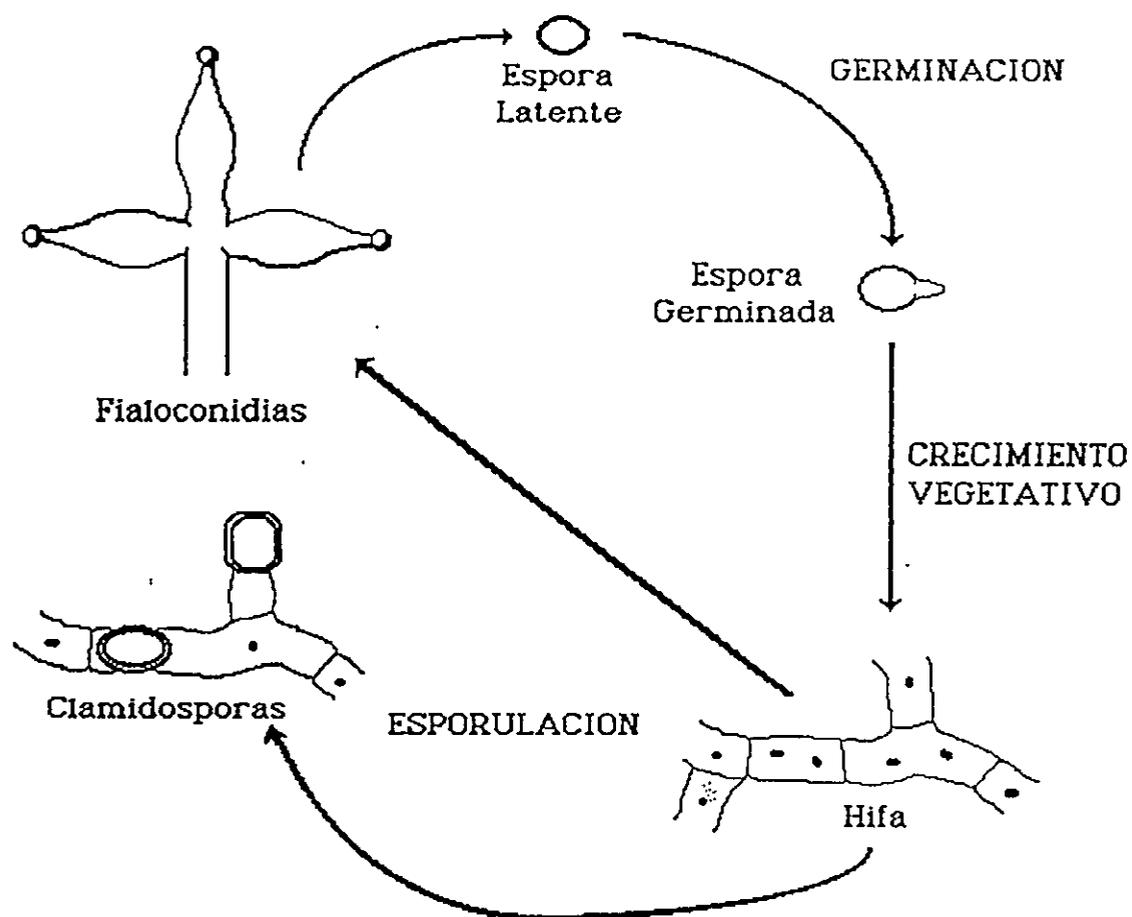


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida para *Trichoderma harzianum*.

agua, ha permitido producir esporas más viables. Esto último, parece relacionado con la acumulación de azúcares endógenos como trehalosa (Jin y cols., 1991).

Actualmente, está en evaluación la factibilidad de producir las esporas de *T. harzianum* bajo la modalidad conocida como cultivo sobre sustrato sólido. Bajo estas condiciones, el crecimiento microbiano se realiza en ausencia de agua libre y como sustratos se utilizan generalmente subproductos agrícolas (Gutiérrez, 1989). Utilizando tal modalidad de cultivo, se han producido esporas de *Trichoderma* (Lewis y Papavizas, 1983; 1984). Las propiedades de las esporas así producidas que pudieran ser relevantes para su aplicación como biopesticida, no han sido estudiadas.

Recientemente, se compararon bajo condiciones de campo el comportamiento de las esporas de *T. harzianum* producidas mediante las modalidades discutidas anteriormente. Los resultados obtenidos mostraron que las esporas producidas mediante cultivo sobre sustrato sólido tuvieron un mejor comportamiento como agentes de biocontrol (Tabla 1). En efecto, tales esporas redujeron el grado de infección de la uva de mesa con *B. cinerea*, siendo *T. harzianum* capaz de mantenerse mejor en el racimo (Tabla 1).

Tabla 1
Efecto de la forma de producción de esporas de *T. harzianum* sobre el grado de infección de uva de mesa⁽¹⁾ con *Botrytis cinerea*.

Sistema de producción de esporas de <i>T. harzianum</i>	Flores colonizadas (%)	
	con <i>B. cinerea</i> (2)	con <i>T.harzianum</i> (3)
Cultivos líquidos agitados	11.0	45.6
Cultivos sobre sustrato sólido	4.3	69.0
Control	29.7	0.0

(1) Variedad Thompson seedless

(2) Los racimos fueron inoculados, durante la etapa de floración, con esporas de *T. harzianum* asperjando una solución que contenía 2×10^6 esporas/mL. 4 días después se agregó, de la misma manera, una similar suspensión de esporas de *B. cinerea*. Los racimos se mantuvieron en cámara húmeda en el campo.

(3) 48 h después de la adición de *B. cinerea* se colectaron racimos los que fueron incubados por 7 días en placas con PDA. Los porcentajes representan la proporción de flores con presencia de *B. cinerea* o *T. harzianum*. Se analizaron 500 flores por tratamiento.

Fuente: Bernardo Latorre. 1994. Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Chile.

La elucidación de las causas de este comportamiento diferencial sería importante para el óptimo desarrollo de *T. harzianum* como biopesticida. Para poder llegar a comprender tal fenómeno es crítico considerar los factores que inciden sobre la eficacia del agente de control al aplicarse en el filoplano.

1.4. Factores que inciden sobre la efectividad de biopesticidas.

Todo el proceso productivo del biopesticida va dirigido a la obtención de preparados del agente con alta viabilidad, los que al ser aplicados resistan las condiciones adversas de campo y expresen su actividad antagónica (Andrews, 1992; Lewis y Papavizas, 1991; Lisanky, 1989).

Bajo las condiciones de campo, el primer evento que debe ocurrir consiste en la efectiva adhesión del biopesticida a sustratos o superficies (Elad y Kirsshner, 1993; Doss y cols., 1992; Gareth, 1994). Para el caso de aplicarse en el filoplano, el agente debe adherirse a la superficie de frutos y hojas. Estas generalmente son hidrofóbicas. Una vez adherido, el agente debe resistir las condiciones ambientales adversas, manteniéndose viable para desarrollar su capacidad antagónica. Antes de que ocurra lo anterior, y para el caso de las esporas, estas deben obligadamente germinar. La razón de esto es que las esporas representan una forma distinta

microorganismo vegetativo y es solo en este último estado es posible la expresión del antagonismo (Eveleigh, 1985; Goldman y cols., 1994).

1.5. Características de las esporas fúngicas no germinantes.

La espora "madura" estaría en un estado de latencia, *i.e.* sin actividad metabólica, la que se reactiva según las condiciones externas. Presentan, además, una notable resistencia frente a agentes deletéreos. Es por esto, que se le ha asignado a la espora la función de elemento de persistencia y/o propágulo de dispersión para alcanzar condiciones favorables para el crecimiento, bajo las cuales germina (Cole, 1986; Van Etten y cols., 1983).

1.5.1. Estado de latencia de las esporas.

Se ha definido la latencia como un período de tiempo en el cual se ha interrumpido en forma reversible el desarrollo fenotípico de un organismo (Sussman y Douthit, 1973). Bajo el estado latente, las esporas no manifiestan actividad metabólica detectable. Han sido invocados mecanismos de diversa naturaleza para explicar tal condición. Estos incluyen barreras de permeabilidad, anhidrobiosis, inhibición de la síntesis *de novo* de enzimas o cambios conformacionales de enzimas pre-existentes, separación espacial de sustratos y enzimas mediante compartimentalización y producción de auto inhibidores (Van Etten y cols., 1983). No necesariamente estos mecanismos se excluyen mutuamente.

1.5.2. Rol de la pared y componentes de superficie de la espora.

Los componentes estructurales más externos de la espora están relacionados con las primeras interacciones que este tipo de célula pudiera establecer con el medio que lo rodea (Gareth, 1994). Estos componentes de superficie le confieren propiedades de adhesión (Boucias y cols., 1988; Gareth, 1994) y de protección (Beever y Dempsey, 1978) a las esporas. También han sido ubicadas un conjunto de enzimas líticas (Kubicek, 1987) y proteínas protectoras (Nicholson y Moraes, 1981; Nicholson y cols., 1986). Ultraestructuralmente, las paredes de las esporas varían en relación al número de capas y densidad electrónica cuando se analizan al microscopio electrónico (Van Etten y cols., 1983). Generalmente se distinguen dos capas, siendo usualmente la externa más electrondensa que la interna.

Se han encontrado sobre la superficie de algunas esporas la presencia de un particular tipo de estructuras denominadas "rodlets" (Beever y Dempsey, 1978; Cole, 1986; Cole y Pope, 1981; Boucias y cols., 1988). La presencia de tales estructuras se ha relacionado con el carácter hidrofóbico de las esporas que los poseen (Beever y Dempsey, 1978; Cole, 1986; Doss y cols., 1993). Esta última propiedad favorece la adhesión no específica a sustratos hidrofóbicos (Boucias y cols., 1988; Doss y cols., 1993). Esto último, se podría considerar como un evento pasivo, que iniciaría la colonización de un determinado nicho ecológico (Gareth, 1994).

1.6. Hidrofobinas.

Estas proteínas se descubrieron como producto de genes altamente expresados durante el desarrollo de los cuerpos fructíferos y micelio aéreo del basidiomicete *Schizophyllum commune* (Dons y cols, 1984; Mulder y Wessels, 1986). La secuenciación de algunos de estos genes y sus correspondientes cDNAs revelaron la existencia de al menos tres familias de pequeñas proteínas (alrededor de 100 aminoácidos), moderadamente hidrofóbicas, con señales de secreción y 8 residuos de cisteínas característicamente espaciadas (Schuren y Wessels, 1990). Estas proteínas se identificaron en la pared de las hifas de estructuras aéreas y fueron denominadas hidrofobinas (Wessels y cols., 1991).

Posteriormente, un número considerable de genes, abundantemente expresados en otros hongos, han sido identificados como hidrofobinas mediante comparación de sus secuencias (ver Figura 2; Wessels, 1994). A nivel nucleotídico sin embargo, las secuencias de tales genes son bastante divergentes. Incluso las tres hidrofobinas de *S. commune*, *sc3*, *sc4* y *sc1* poseen solamente un 45% de homología en la secuencia codificadora y no presentan hibridización cruzada. A nivel aminoacídico y considerando sustituciones conservativas, la homología mejora dando un 39% de identidad y un 41% de similaridad. Si en tales comparaciones se consideran las proteínas RODA de *Aspergillus nidulans* y EAS de *Neurospora crassa* la identidad cae a 11% y la similaridad a 23% (Wessels, 1994). Sin embargo, si todas las proteínas son alineadas

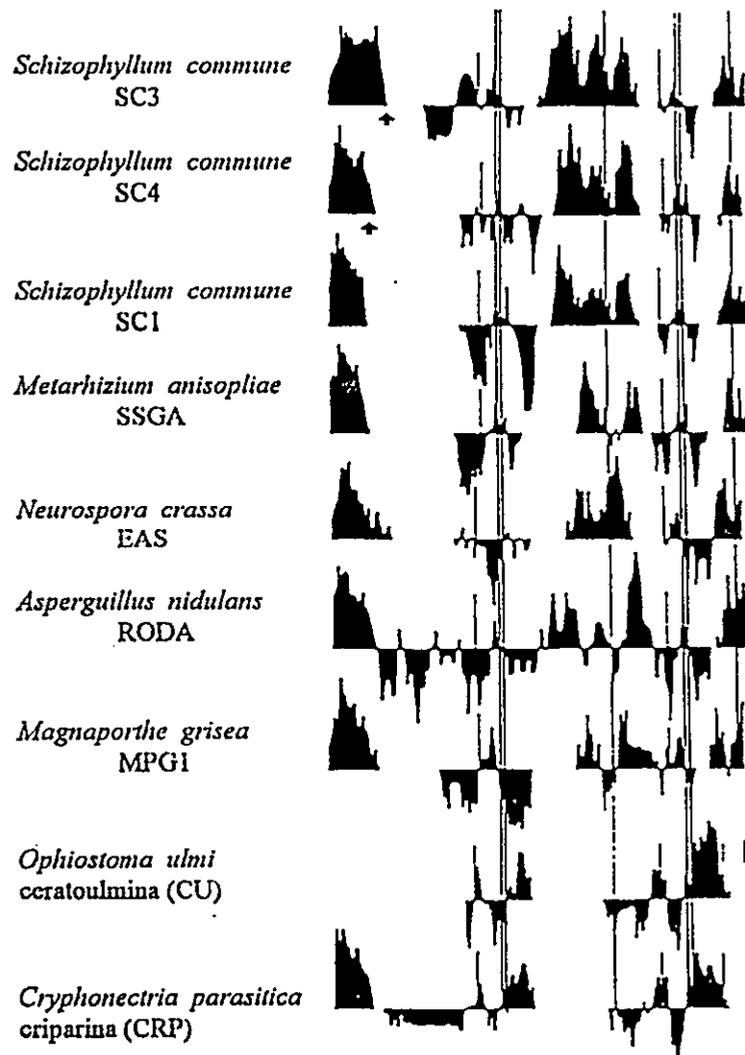


Figura 2. Comparación de los perfiles hidropáticos de hidrofobinas (Wessels, 1994). La zona sobre la línea de la abcisa representa regiones hidrofóbicas. Los perfiles se alinearon alrededor de los residuos conservados de cisteína (primer y segundo doblete y cuarto y octavo residuos). Se dejaron espacios en la secuencia donde las regiones hidrofóbicas se alternaron con las hidrofílicas. En los casos en que se conoce, el extremo aminoterminal de las proteínas maduras está indicado con una flecha. Nótese que las primeras 7 hidrofobinas (clase I) tienen un patrón similar, que difiere del presentado por las últimas dos (hidrofobinas de clase II).

con respecto a la posición de sus cisteínas, sus perfiles hidropáticos muestran una fuerte similaridad, excepto para ceratoulmina y criparina (CU y CRP, respectivamente; Figura 2; Wessels, 1994). Por tal razón, estas últimas proteínas se han denominado hidrofobinas de clase II, para distinguirlas de las anteriores, hidrofobinas de clase I.

Las hidrofobinas de clase II fueron inicialmente identificadas como proteínas altamente excretadas, mientras que las de clase I han sido identificadas como los probables productos de genes altamente expresados en ciertos estados de desarrollo del hongo. Hasta la fecha, solo las proteínas codificadas por los genes *sc3* y *sc4* de *S. commune* han sido identificadas (Wessels y cols., 1991).

1.6.1. Rol de las hidrofobinas.

La hidrofobina SC3 fue purificada y alguna de sus propiedades determinadas (Wöesten y cols., 1993;1994). Esta se encuentra asociada -en el micelio aéreo- en un complejo de alta masa molecular, insoluble en SDS caliente. Estos complejos pueden ser disociados a su forma monomérica en ácido per fórmico o trifluoroacético concentrados fríos. Tales características podrían haber mantenido a las hidrofobinas desapercibidas, a pesar de ser proteínas abundantes. Cuando el hongo se cultiva en medio líquido, SC3 se encuentra en el líquido de cultivo bajo su forma monomérica (ver Figura 3). Al agitar el líquido, ésta se asocia espontáneamente en complejos insolubles en SDS. Análisis *in vitro* de SC3 han

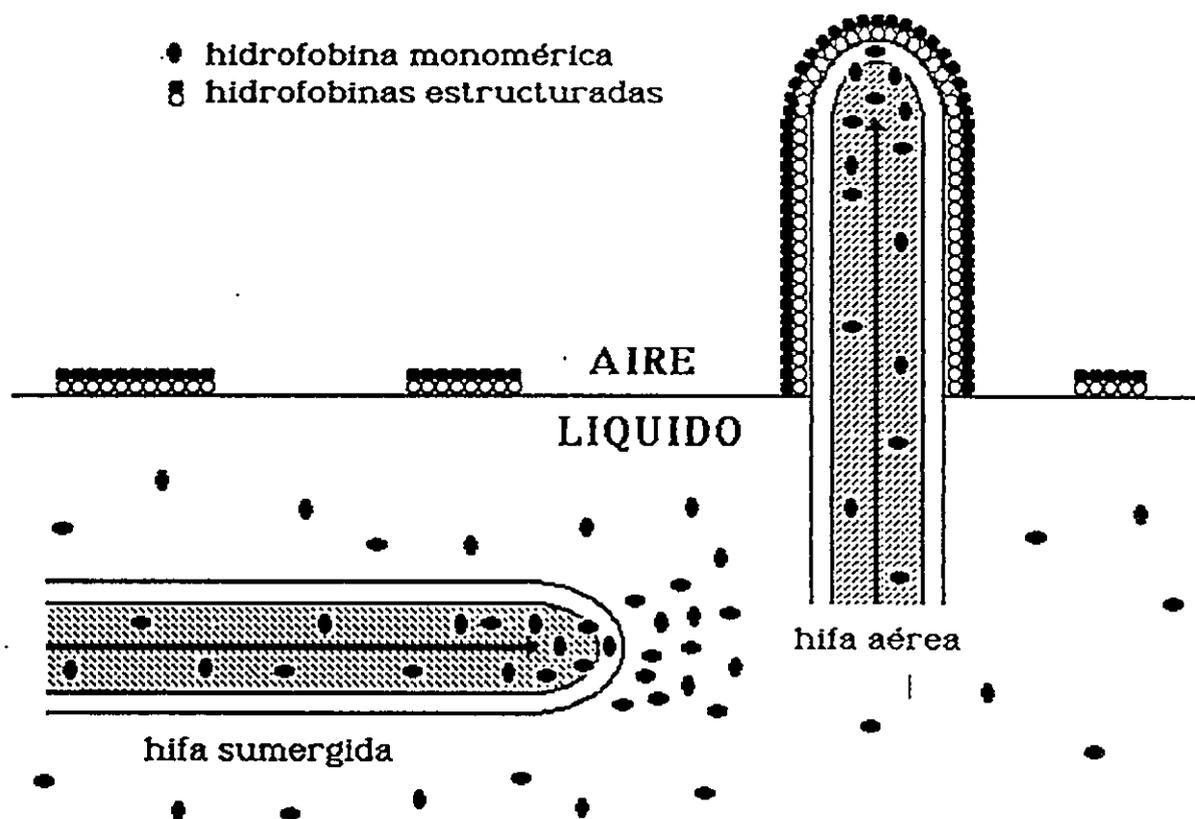


Figura 3. Modelo propuesto para la formación de los rodlets en *Schizophyllum commune* (Wöesten et al., 1994, Wessels, 1994). La flecha, dentro de la hifa, indica el transporte de monómeros de la hidrofobina de clase I SC3 hacia el ápice en crecimiento en donde es secretada. En la hifa sumergida SC3 difunde al medio de cultivo. En la hifa aérea, SC3 se ensambla en la superficie como una membrana amfipática inducida por la presencia de la interfase hidrofílica/hidrofóbica de la pared de la hifa y el aire. SC3 presente en el medio de cultivo podría ensamblarse en la superficie del líquido, pero su concentración en el medio es más baja que en el ápice de la hifa aérea.

llevado a proponer que la confrontación del monómero con una interface hidrofóbica/hidrofílica causa un cambio conformacional en la proteína que resulta en la formación de un ensamblaje bidimensional (tipo membrana, ver Figura 3) con los grupos polares hacia el lado hidrofílico y los apolares hacia el hidrofóbico (Wöesten y cols., 1993;1994; Wessels, 1994).

Mediante técnicas de genética molecular se han podido generar mutantes, en varios hongos, de modo que no expresen el gen de la hidrofobina. En tales mutantes, se aprecia el fenotipo de ser "facilmente mojables" -hidrofílicos- y falla la dispersión aérea de las esporas (Wessels, 1994). Además, no se observan "rodlets" en la superficie del tejido aéreo, confirmando los roles inicialmente propuestos para tales estructuras y comentados en el punto precedente. Por lo tanto, aparte de un rol estructural, las hidrofobinas estaría involucradas en procesos de adhesión y patogénesis (Wessels, 1994). Efectivamente, los genes de hidrofobinas *ssg1* en el patógeno de insecto *Metharhyzium anisopleae* (Legers y cols., 1992) y *mpg1* del fitopatógeno *Magnaporthea grisea* (Talbot y cols., 1993), se expresan bajo condiciones que llevan al desarrollo de la patogénesis. La inactivación de MPG1 reduce la habilidad de producir los síntomas de la enfermedad (Talbot y cols., 1993).

Aunque aún en debate, las hidrofobinas de clase II, ceratoulmina (CU) y criparina (CRP), aparecen como toxinas de la marchitez en arboles (Wessels, 1994). Ambas son producidas extracelularmente en grandes cantidades por los fitopatógenos, *Ophiostoma ulmi* (Russo y cols., 1982) y *Cryphonectria parasitica* (Carpenter y cols., 1992), respectivamente. Ambas proteínas se encuentran presentes en las estructuras aéreas de estos hongos (Svircek y cols., 1988; Carpenter y cols., 1992), aunque hay que destacar el hecho que, en tales hongos, no se han descrito estructuras tipo rodlets. Al igual que SC3, CU y CRP se ensamblan en la interfase aire/agua. Sin embargo, tales agregados son mucho menos estables y se disocian rápidamente en agua y soluciones etanólicas (Russo y cols., 1982; Carpenter y cols., 1992).

1.6.2. Hidrofobinas en *Trichoderma*.

Recientemente, se han identificado dos hidrofobinas de clase II en *Trichoderma reesei*, HFB1 y HFB2 (Nakari y cols., 1995a, 1995b). Esto sugiere que las hidrofobinas de esta clase no serían específicas para hongos fitopatógenos. Además, sería el primer hongo en donde se describen dos hidrofobinas de esta clase.

Ambas hidrofobinas fueron descubiertas genéticamente. *hfb2* se aisló previamente como un gen altamente expresado en glucosa (Nakari y cols., 1995a), mientras que *hfb2* fue posteriormente aislado mediante hibridación heteróloga usando *hfb1* como sonda

(Nakari y cols., 1995b). Ambas proteínas, maduras, tendrían una baja masa molecular (75 y 71 kDa para HFB1 y HFB2, respectivamente), según se deduce de las correspondientes secuencias nucleotídicas. Son bastante parecidas entre sí (Figura 4), con un porcentaje de identidad y similaridad de un 64% y un 69%, respectivamente. Son, además, bastante similares a CRP y CU, siendo HFB1 más similar que HFB2 (61% y 48% versus 58% y 46%; ver Figura 5; Nakari y cols., 1995a, 1995b).

La expresión de los genes *hfb1* y *hfb2* es divergente (Nakari y cols., 1995b). En efecto, *hfb1* se expresó solamente en medios que contenían glucosa o sorbitol como fuentes de carbono. No se detectó en medios donde la fuente de carbono era celulosa, xilano, celobiosa o lactosa, condiciones bajo las cuales *hfb2* fue altamente expresado. La expresión de *hfb2* fue, además, altamente inducida por limitación en carbono, nitrógeno, por luz y en cultivos bajo activa esporulación. HFB1 fue detectada tanto en la pared celular del micelio vegetativo como en el líquido de cultivo donde el hongo había crecido utilizando glucosa como fuente de carbono (Nakari y cols., 1995a). HFB2, su vez, fue detectada en esporas y en el líquido de cultivo de medios con lactosa como fuente de carbono (Nakari y cols., 1995b).

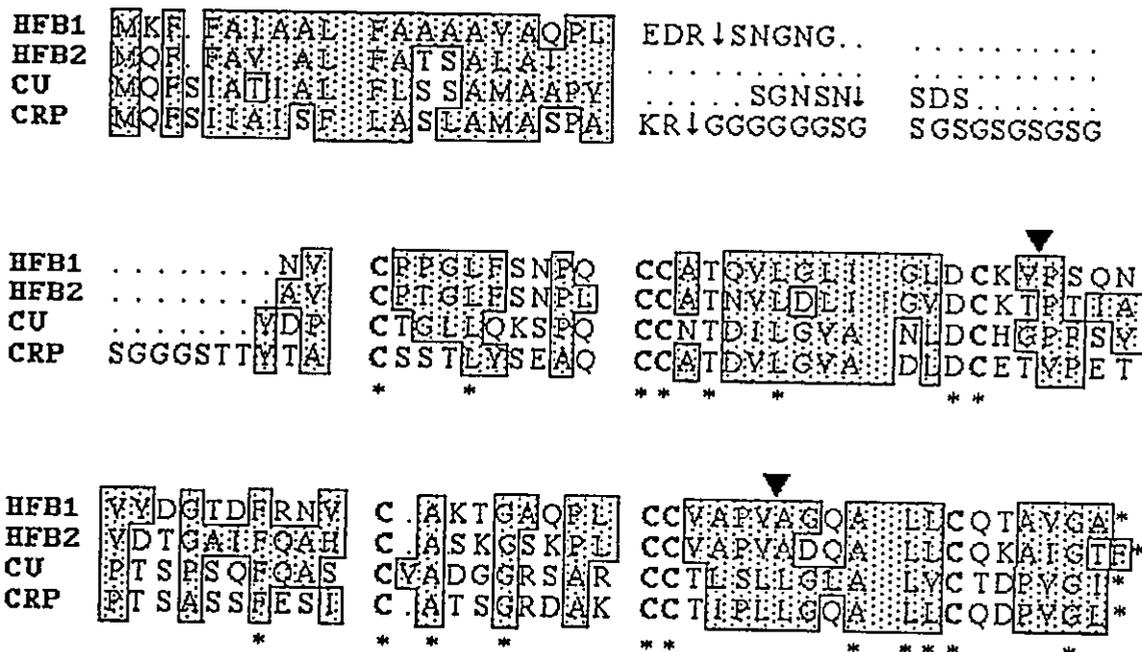


Figura 4. Alineación de la secuencia aminoacídica de las hidrofobinas de clase II. Las secuencias corresponden a las hidrofobinas de *T. reesei* HFB1 (HFB1) y HFB2 (HFB2), ceratoulmina (CU) de *O. ulmi* y criparina (CRP) de *C. parasitica*. Las posiciones del extremo N-terminal de las proteínas maduras así como los intrones se indican mediante flechas y triángulos, respectivamente. Los aminoácidos conservados se indican con asteriscos debajo de las secuencias. Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos se muestran en las casillas sombreadas (adaptado de Nakari y cols., 1995b).

La información disponible indica que HFB1 se relacionaría con el estado vegetativo de *T. reesei*, mientras que HFB2 estaría ligada a la espora. Esta última hidrofobina por expresarse bajo condiciones que permiten la celulolisis podría relacionarse con la adhesión del micelio a sustratos complejos e insolubles como la celulosa (Nakari y cols., 1995b).

1.7. Activación de la espora latente.

Se puede considerar como activación de la espora a cualquier tratamiento que induzca o estimule la germinación (Van Etten y cols., 1983). La activación, generalmente involucra manipulaciones como la incubación de las esporas en agua o solución de algún compuesto. Este último puede ser utilizado o no como nutriente (Cotter, 1981).

Por otro lado, el tratamiento físico más utilizado en muchas especies de hongos consiste en cortas exposiciones a elevadas temperaturas. Los regímenes en cuanto a tiempo de exposición y temperatura varían entre las especies. La activación a baja temperatura es mucho menos frecuente (Van Etten y cols., 1983).

1.7.1. Efecto de nutrientes.

Muchas esporas fúngicas germinan al proveerlas con compuestos considerados normalmente como nutrientes, los cuales podrían utilizarse como fuente de carbono y/o nitrógeno. Este es el

método más utilizado para inducir la germinación (Van Etten et al., 1983). En caso de actuar como nutriente, un compuesto debería ser utilizado durante la germinación y detener el proceso al ser removido del medio.

En conidias de *N. crassa* se encontró que la presencia de 3-O-metil-D-glucosa, un análogo no tóxico y no metabolizable de la glucosa, en el medio de germinación podía activar transientemente la síntesis de proteína, pero no de RNA (Bonnen y Brambl, 1983). Esto llevó a sugerir que la glucosa podría actuar como una señal para activar la síntesis de proteína y que luego se requeriría cualquier fuente de carbono para mantenerla.

Una situación similar se ha descrito para las ascosporas de levaduras. Los primeros eventos de la germinación, como la activación de la enzima trehalasa y la consecuente degradación de trehalosa, se desencadenarían ante la presencia de nutrientes (Thevelein y cols., 1984). Estos serían "sensados" por moléculas específicas, desencadenando una serie de eventos intracelulares en cascada, donde están involucradas proteínas tipo RAS, adenilato ciclasa y fosforilaciones (Thevelein, 1991)

1.7.2. Mecanismo de la activación.

Muchas de las esporas más estudiadas se activan mediante más de un tratamiento. Es razonable que algunos de ellos imiten los efectos de otros. Cotter (1981) propone que para el caso de *Dictyostelium discoideum* la activación se desencadenaría mediante eventos en cascada. Este desencadenamiento puede ser regulado por varios activadores, autoactivadores, autoinhibidores y quizás AMPc. De este modo, existiría un solo sitio que mantendría la latencia, pero múltiples formas de afectarlo. Los cambios conformacionales de la región hidrofílica de una proteína ubicada en la cara interna de la mitocondria, estaría involucrada en la activación (Cotter, 1981). Estudios de requerimientos de temperatura para la activación de esporas de *Phycomiyes blakesleanus* a altas presiones, también, evidencian la participación de una proteína (Furch, 1981).

Sin embargo, debido a que la activación se puede realizar mediante diversos métodos, con distintos mecanismos, y a la diversidad de los hongos, no existe una razón para especular acerca de la universalidad de un mecanismo de activación. A este respecto, los trabajos realizados en *N. crassa* (Brambl y cols., 1978; Brambl, 1981; Bonen y Brambl, 1983) apuntan a que la activación de la germinación dependería de varios estímulos. Estos desencadenarían diferentes respuestas metabólicas, cuya interacción iniciarían y mantendrían la germinación.

1.8. Germinación de esporas fúngicas.

Sussman y Douthit (1973) definen la germinación como "el primer estado irreversible que es reconocidamente diferente del estado latente mediante algún criterio morfológico, citológico fisiológico o bioquímico". En hongos, la aparición del tubo germinativo indica morfológicamente la culminación de este proceso. A medida que se utilizan técnicas más sensitivas, se descubre que muchos eventos ocurren luego de algunos minutos de colocar las esporas bajo condiciones de germinación (Van Etten y cols., 1983). Según la definición anterior, tales esporas habrían germinado, aún cuando el tubo germinativo tarde horas en aparecer.

Desde un punto de vista práctico es más fácil considerar la germinación morfológicamente, cuando se ha formado el tubo germinativo. De esta manera, los eventos asociados con la germinación se pueden considerar esenciales o no según aparezcan en forma temprana o tardía en el proceso general (Van Etten y cols., 1983).

Por último, la germinación involucraría la expresión de un programa genético específico (Ennis y cols, 1988; Ramalingan y cols., 1992). Por esto puede tomarse la germinación como modelo para estudiar procesos de diferenciación celular. Por otro lado, esto implica que el crecimiento vegetativo no sería necesariamente una simple extensión de los eventos asociados con la formación del tubo

germinativo y otro programa de desarrollo podría ser establecido (Van Etten y cols., 1983).

Si bien los procesos de esporulación y germinación involucran diferentes programas de expresión genética (Timberlake, 1990; Ennis y cols, 1988), ambos estarían relacionados. Se ha propuesto que los primeros eventos de la germinación se programarían durante la esporulación (Brody, 1981). Por lo tanto, podrían considerarse ambos como un solo proceso, el que a veces está interrumpido por un indefinido período de latencia. La esporulación se podrá considerar como exitosa cuando la espora haya germinado.

1.8.1. Establecimiento de la actividad metabólica.

Una vez situadas en condiciones germinativas, las esporas entran en un activo metabolismo. Esto se refleja en el dramático aumento, 10-30 veces, del consumo de oxígeno por parte de las esporas germinantes (Van Etten y cols., 1983). Brambl (1981) examinó el desarrollo del sistema mitocondrial de transporte de electrones durante la germinación de *Botryodiplodia theobromae*. Las esporas de este hongo no poseen actividad detectable de citocromo oxidasa, sino hasta 60-120 min después de incubada la espora bajo condiciones germinativas. Esta situación se debería a un problema de compartimentalización de las subunidades de la enzima. El desarrollo de la actividad dependería de modificaciones y reordenamientos de algunas subunidades preservadas en el

citoplasma para que ingresen a la mitocondria y se ensamble la enzima activa.

Uno de los eventos tempranos asociados con la germinación es el rápido aumento en la velocidad de la síntesis proteica. La síntesis citoplasmática es esencial para la formación del tubo germinativo en todos los hongos (Brambl y cols., 1978). La síntesis mitocondrial, en cambio, no sería requerida para la formación del tubo germinativo en los casos de *B. theobromae*, *N. crassa* y *S. cerevisiae* (Brambl, 1981).

1.8.2. Rol de aminoácidos y metabolismo del nitrógeno.

En conidias de *N. crassa*, glutamato se encuentra almacenado a un nivel correspondiente al 2.5% del peso de las esporas (Schmidt y Brody, 1975). Durante la germinación ocurre una rápida -en término de minutos- disminución en el contenido de glutamato, un aumento transiente de NADH y NADPH y la conversión de grupos tioles a su forma reducida (Schmidt y Brody, 1975; Brody, 1981). La degradación del glutamato se realiza a través de una vía como la mostrada en la Figura 5A. La enzima glutamato descarboxilasa sería específica de las esporas. En efecto, solo se expresa durante la esporulación, acumulándose en las conidias (Hao y Schmidt, 1993). Esta secuencia de eventos se desarrollan en ausencia de nutrientes, es decir, al incubar las esporas en agua (Schmidt y Brody, 1975) y durante el almacenamiento a altas humedades (Fahey y cols., 1978).

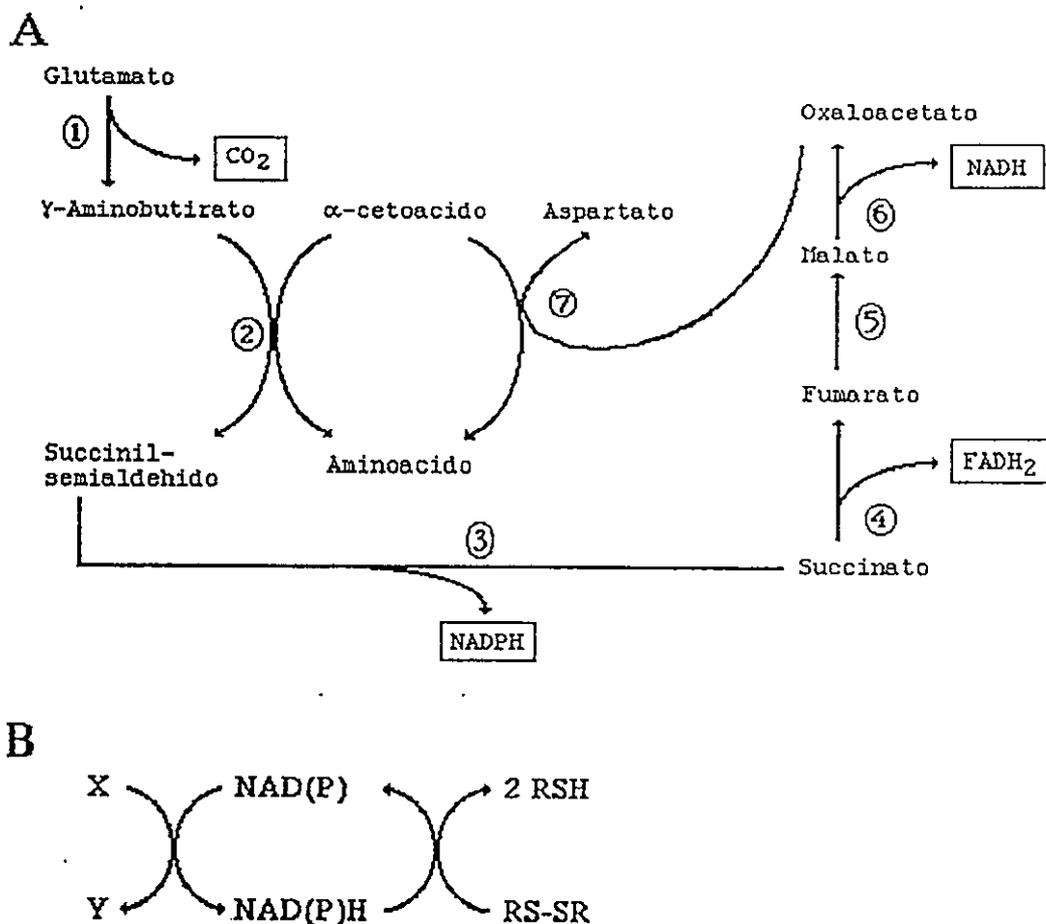


Figura 5. Esquema de los primeros eventos metabólicos desarrollados durante la germinación de esporas de *Neurospora crassa*. A, ruta catabólica del glutamato durante la germinación (Schmidt y Brody, 1975). Los números indican las actividades enzimáticas involucradas y las cajas muestran los principales productos de degradación. 1, glutamato descarboxilasa; 2, γ -aminobutirato- α -cetoglutarato transaminasa; 3, succinil semialdehido deshidrogenasa; 4, succinato deshidrogenasa; 5, fumarasa; 6, malato deshidrogenasa; 7, glutamato-oxaloacetato transaminasa. B, modelo general para la generación de poder reductor durante los primeros estados de la germinación (Brody, 1981). La utilización del compuesto generador, X (glutamato para *N. crassa*), produciría un aumento del poder reductor que, a su vez, reduciría glutatona y/u otros compuestos tiólicos, R, que podrían ser proteínas específicas.

Se ha propuesto para el catabolismo germinativo del glutamato, un rol de generación de poder reductor (Figura 5B). Esto último, podría reducir los grupos sulfidrilo de proteínas, llevando a la activación de enzimas críticas (Schmidt y Brody, 1975; Brody, 1981). Este esquema podría extenderse a otras esporas, en donde, polialcoholes y otros aminoácidos como prolina tendrían la función generadora de NAD(P)H (Brody, 1981).

Los aminoácidos glutamato y glutamina se encuentran generalmente como fuentes de nitrógeno que son asimiladas preferentemente (Mora, 1991; Marzluf, 1981). Interesantemente, estos aminoácidos se encuentran acumulados en altas concentraciones en esporas que germinan rápidamente (3-4 horas) como *N. crassa* (Schmidt y Brody, 1975) y *D. discoideum* (Klein y cols., 1990).

Glutamina es considerada como el producto final de la asimilación de compuestos nitrogenados, por lo que indicaría intracelularmente el estatus nitrogenado extracelular (Mora, 1991; Marzluf, 1981). En *N. crassa*, glutamina y glutamato forman parte de un ciclo al cual se le ha atribuido el rol de disipar el exceso de energía producida por los procesos catabólicos (Mora, 1991). En efecto, como se muestra en la Figura 6, la síntesis de glutamina y glutamato consumiría NADPH y ATP, los cuales al producirse en exceso podrían detener el flujo de compuestos carbonados y por ende el metabolismo celular. Así, el funcionamiento de este ciclo

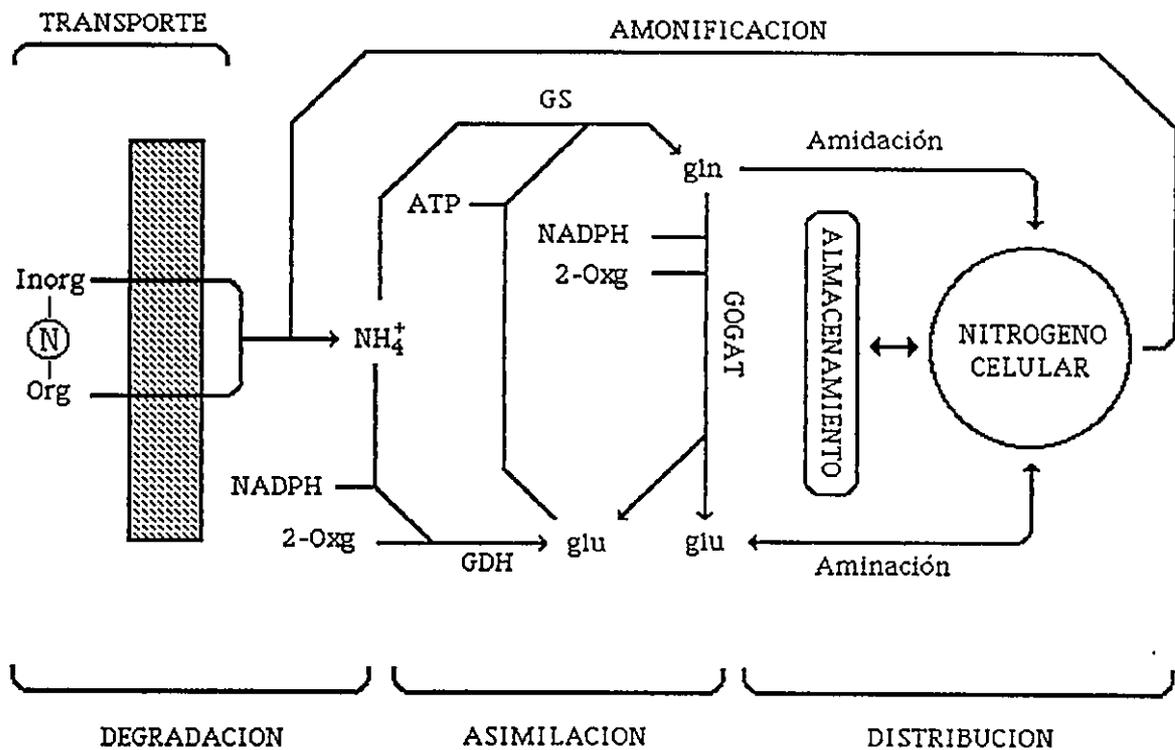


Figura 6. Esquema propuesto para el metabolismo del nitrógeno en *N. crassa* (Mora, 1991). Abreviaturas : glu, glutamato; gln, glutamina; 2-oxg, 2-oxoglutarato; GS, glutamina sintetasa; GDH, glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP; GOGAT, glutamato sintasa.

mantendría un adecuado flujo y distribución de compuestos carbonados y nitrogenados según las demandas celulares.

Además, se le ha asignado a glutamina el rol de efector metabólico del sistema de represión catabólica por nitrógeno tanto en *A. nidulans* como en *N. crassa* (Marzluf, 1981). La disminución del nitrógeno disponible extracelular produciría una disminución del contenido intracelular de glutamina. Esto permitiría la acción de la proteína involucrada en activar la expresión de genes regulados por nitrógeno (NIT2 y ARE A para *N. crassa* y *A. nidulans*, respectivamente).

1.8.3. Germinación en *Trichoderma*.

La mayoría de los trabajos se han realizado en *Trichoderma viride*. Las esporas de esta especie requerirían de fuentes tanto de carbono como de nitrógeno para la germinación. El nitrógeno orgánico aparece como el principal requerimiento y mejor condición nutricional para la germinación (Jackson y cols., 1991; Davey y Danielson, 1973).

El tubo germinativo se aprecia en un 95% de las esporas después de 12 h de incubación (Rosen y cols, 1974). Este lapso de tiempo es 3 veces más largo que el requerido para la germinación de otros hongos, tales como *N. crassa* (Bonen y Brambl, 1983). En este proceso no participarían autoinhibidores ni autoactivadores (Rosen y cols, 1974).

En esporas de *T. harzianum* producidas en medios líquidos con actividad de agua modificada, se han encontrado niveles de 0.05% de sorbitol y cantidades aún menores de trehalosa (Jin y cols., 1991). Se desconoce que otro tipo de compuestos endógenos podrían almacenar las esporas de *Trichoderma* y cual podría ser su función.

1.9. Presentación del trabajo.

Para que las esporas de *T. harzianum* actúen eficientemente como agentes de biocontrol, estas deben adherirse y luego germinar. Como lo muestran los antecedentes presentados, el comportamiento de las esporas dependerá de las interacciones entre factores externos, exógenos o ambientales con aquellos endógenos constitutivos de las mismas. Estos últimos, sin embargo, serán los responsables del tipo de respuesta que se establezca frente al medio ambiente.

1.9.1. Objetivo general.

El objetivo general de esta tesis es determinar propiedades de las esporas de *Trichoderma harzianum* relevantes para fines de biocontrol, contribuyendo a la elucidación de los factores involucrados con la adhesión a superficies hidrofóbicas y la modalidad para desencadenar el proceso germinativo.

1.9.2. Hipótesis del trabajo.

Por ser *Trichoderma* un hongo de suelo, la esporulación sobre tejido aéreo -esporas "aéreas"- representa la modalidad seleccionada en la naturaleza en donde se formarían aquellos factores que le otorgan a la spora la constitución óptima para cumplir su función. Por lo tanto, las esporas aéreas poseerían mejores características en cuanto a resistencia, dispersión y adhesión. Para lo último, se podría relacionar con la presencia de hidrofobinas en las esporas. Sin embargo, estas esporas no estarían preparadas para una rápida germinación debido a que no poseerían un alto nivel de aminoácidos almacenados.

1.9.3. Objetivos específicos.

1. Determinar la evolución de los cambios morfológicos durante la conidiogénesis aérea de *T. harzianum*.
2. Comparar las esporas aéreas con aquellas producidas en cultivos líquidos en cuanto a su resistencia a condiciones adversas y comportamiento hidrofóbico.
3. Identificar la presencia de proteínas tipo hidrofobinas en *T. harzianum*, específicamente en las esporas aéreas.
4. Determinar las condiciones óptimas para la germinación de las esporas aéreas.

5. Analizar los cambios morfológicos y metabólicos desarrollados durante la germinación determinando aquellos más tempranos.
6. Evaluar el establecimiento y desarrollo del metabolismo de compuestos nitrogenados durante la germinación.
7. Evaluar el efecto de las condiciones nutricionales exógenas sobre la activación del evento germinativo más temprano.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Reactivos químicos.

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados fueron grado pro-análisis. En casos relevantes, se indica la marca.

2.2. Microorganismos.

Como modelo de estudio se utilizó la cepa P1 de *Trichoderma harzianum*. Esta cepa fue gentilmente donada por el Dr Arne Trosno (Agricultural University of Norway) y presenta actividad antagónica contra *Botrytis cinerea* (Tronsmo, 1991). La cepa fue mantenida como esporas, preservadas en silica gel (Davis y Serres, 1970) y fue subcultivada periódicamente en el medio AMLI (definido más adelante).

En algunos experimentos se utilizó la cepa QM 9414 de *Trichoderma reesei*, gentilmente proporcionada por la Dra. Merja Penttilä (Biotechnology and Food Research, VTT, Finlandia). Esta cepa fue mantenida en PDA (definido más adelante).

2.3. Medios de cultivo.

2.3.1. Medio para producir esporas aéreas.

Se utilizaron placas de Petri con el medio AMLI, cuya composición es: agar 1.5 %, extracto de malta 2%, extracto de levadura 0.2% y 0.1% del detergente Igepal CO-600 (Alltech Associates, Deerfield, IL, USA). Este medio pero sin el detergente (AML) se utilizó para obtener micelio aéreo vegetativo (no esporulante) de *T. harzianum*.

Para el caso específico de *T. reesei*, se utilizaron placas de Petri con el medio agar-papa-dextrosa (PDA, HiMedia®). Este medio se utilizó, además, para los experimentos de fotoinducción de la esporulación en *T. harzianum*.

2.3.2. Medio para producir esporas sumergidas.

Se utilizó un medio líquido de esporulación (MLE) cuya composición en gramos por litro es: Extracto de malta 12.2 g, KNO_3 10 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g. El pH del medio se ajustó a 5.0 con NaOH. Después de esterilizar el medio se agregaron esterilmente: 1 mL de Tiamina 0.1% (Merck), 2 mL de Triptona 20% (Gibco-BRL) y 1 mL de Solución Mineral I. La composición, en miligramos por litro, de la Solución Mineral I es: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 33.3 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg.

2.3.3. Medio de germinación (MG).

Este contenía glucosa 1% como fuente de carbono, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, KCl 0.2% y 10 mL por litro de la Solución Mineral II. La fuente de nitrógeno fue variable y correspondía a 20 mM, excepto cuando se utilizó peptona, la que se agregó 0.5%. La Solución Mineral II estaba compuesta, en gramos por litro, por : $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02 g, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 0.02 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.02 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.02 g y $Na_4EDTA \cdot H_2O$ 0.6 g.

Usualmente, el medio fue ajustado a pH 4.0 con HCl 2N. Cuando se requirió modificarlo se incluyó en el medio amortiguador fosfato de sodio 100 mM, ajustado al valor de pH requerido.

Para modificar la actividad de agua del medio se adicionó glicerol a diferentes concentraciones, según se ha descrito previamente (Gervais y cols., 1984). Este compuesto no es asimilable por *T. harzianum* como fuente de carbono.

2.4. Condiciones de cultivo.

A menos que se mencione lo contrario todos los cultivos se incubaron a una temperatura de 28°C.

Para las incubaciones de medio líquido (producción de esporas sumergidas y germinación) se utilizaron matraces de Erlenmayer con hasta 1/4 de su volumen con medio de cultivo. Los matraces fueron incubados en un agitador orbital (Lab-Line Instruments, Melrose Park, IL, USA) a 200 rpm.

Para experimentos cinéticos de germinación, que requerían grandes volúmenes de muestra, se utilizó un fermentador New Brunswick (modelo BioFlo IIc) equipado con un vaso de 2.5 L de capacidad. La agitación fue de 300 rpm y la aereación de 0.5 L/min.

Para la fotoinducción se utilizó una ampolleta de luz blanca de 100 W dispuesta a 50 cm sobre las placas. Para el caso de *T. harzianum*, las placas se cultivaron 48 h en oscuridad antes de ser expuestas a la luz, por periodos de hasta 1 h, para ser retornadas a la oscuridad por 24 h más. Con *T. reesei*, en cambio, la iluminación se mantuvo durante todo el período de cultivo.

2.5. Obtención de esporas.

2.5.1. Obtención de esporas aéreas de *T. harzianum*.

Se cultivó el hongo en placas de Petri con el medio AMLI, las que fueron inoculadas centralmente. Después de 15 a 20 días de incubación, las esporas se colectan de los anillos con ayuda de un asa estéril.

2.5.2. Obtención de esporas aéreas de *T. reesei*.

Se inoculan placas de Petri, conteniendo el medio PDA, en forma similar al punto anterior. Después de 7 días de incubación, bajo continua iluminación, el agar se deshidrata mediante liofilización. Las esporas se colectan fácilmente desde la superficie del agar seco.

2.5.3. Obtención de esporas sumergidas de *T. harzianum*.

Se inocularon los matraces con una suspensión de esporas aéreas a una concentración final de 2×10^6 esporas/mL. Esta suspensión se preparó en agua destilada estéril, utilizando un homogenizador de vidrio con vástago de teflón. Los matraces se incubaron por el tiempo que se requiriera, normalmente 96 h. Las esporas producidas se separaron del micelio residual mediante filtración, bajo condiciones estériles, a través de lana de vidrio compactada en una jeringa. El filtrado se centrifugó a $10000 \times g$ por 10 min, descartando el líquido sobrenadante y el residuo de esporas se resuspendió en 1 mL de agua destilada esteril. Esta suspensión se transfirió a un tubo de eppendorf y se centrifugó a $12000 \times g$ por 3 min, obteniendo el residuo final.

2.5.4. Obtención de esporas germinadas de *T. harzianum*.

Se hacen germinar las esporas en el medio MG (punto 2.3.3) el cual se modifica según los estudios requieran. Como inóculo se utiliza una suspensión de esporas, preparadas como en el punto precedente. Generalmente, antes de inocular los matraces se hace

pasar el inóculo a través de una jeringa provista de lana de vidrio para eliminar el micelio residual. Las esporas así tratadas se incuban bajo las condiciones que el experimento requiera. Las muestras se colectan mediante filtración sobre filtros de nitrocelulosa de 1.2 μm de diámetro (Sartorius), lavados con agua fría y traspadas a tubos de eppendorf. Alternativamente, los filtros se congelan a -20°C y se liofilizan para colectar, luego, las esporas al raspar el filtro con una espátula.

2.6. Obtención de micelio aéreo vegetativo y esporulante de *T. harzianum*.

Para obtener micelio aéreo vegetativo (no esporulante) el hongo se cultivó en placas de Petri que contenían el medio AML. En cada placa se colocó un disco de papel filtro Whatman N°1, estéril. En el centro del papel se colocó una gota de una suspensión de esporas (preparada según punto 2.5.3), incubando las placas por 5 días. Al término de esta incubación el papel junto con la biomasa fueron congelados a -70°C , para someterlo a extracción de proteínas o RNA.

Para obtener micelio aéreo esporulante, se procedió tal como se detalló en el parrafo precedente, solo que a los 5 días el filtro de papel fue transferido a placas con AMLI. Después de 24 de incubación, la biomasa se encuentra diferenciada bajo los primeros estados de la esporulación. El filtro es retirado y congelado a -70°C .

2.7. Determinación del índice de germinación y captación del colorante azul de lactofenol.

Una alícuota de 200 μ L de la muestra se mezcla en un tubo de eppendorf con igual volumen de colorante azul de lactofenol (Cotton blue [Aldrich] 0.05 g, fenol 20 g, ac. láctico 20 ml, glicerol 40 mL y 20 mL de agua destilada). Se incuban 5 min a temperatura ambiente, se centrifuga por 5 min a 12000 x g . El residuo de esporas se lava dos veces con agua destilada, por centrifugación, resuspendiendo las esporas finalmente en 200 μ L de agua y se observan al microscopio óptico para realizar los recuentos de esporas germinadas y aquellas que captan colorante.

Se consideró germinada a la espora que presentó el tubo germinativo, mientras que una coloración azul oscura del citoplasma de la espora, indica que esta captó el colorante. Usualmente, se contaron 400 células en total con las cuales se determinó el porcentaje respectivo.

2.8. Determinación del consumo de oxígeno.

Esta determinación se realizó polarográficamente (Brambl, 1975). Se utilizó un electródo de oxígeno conectado a un Biological Oxygen Monitor (Modelo 5300, Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, Ohio, USA) el cual se calibró con agua saturada con aire a 30°C. Se colocaron muestras de 3 ml de suspensiones de esporas en la cámara del electrodo. La caída del oxígeno disuelto

fue monitoreada, durante 10 min, y registrada en un inscriptor Cole Parmer acondicionado de modo que 100 mV correspondían a la deflexión máxima de la escala. Se calculó la tasa de consumo de oxígeno desde la pendiente lineal inscrita.

2.9. Determinación de la captación e incorporación de leucina radioactiva.

Muestras de 10 mL de esporas, colectadas esterilmente bajo diferentes condiciones de germinación, se traspasaron a matraces de 100 ml que contenían 0.25 μCi de $[\text{C}^{14}]$ leucina uniformemente marcada (Amersham, 11.7 GBq/mmol). Los matraces se incubaron 15 min bajo las mismas condiciones en que inicialmente se encontraban las muestras de esporas. Cuando se utilizó cicloheximida, las muestras se preincubaron 15 min con este compuesto (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) antes de someterlas al pulso radioactivo (Brambl y Van Etten, 1970). Los pulsos se detuvieron diluyendo la marca con 2 mL de leucina 10 mM y transfiriendo los matraces inmediatamente a un baño de agua/hielo (0°C).

Para determinar los niveles de incorporación, las muestras fueron luego precipitadas con 1 mL de TCA 70% y se dejaron a 0°C durante una hora. Después se filtraron cuantitativamente a través de filtros de lana de vidrio (GC50, 25 mm de diámetro, MFS). Estos fueron lavados sucesivamente con soluciones frías de TCA 5%, agua, etanol 70% y secados.

Para determinar los niveles de captación total del precursor, las muestras fueron filtradas, rápidamente, una vez detenido el pulso. Los filtros se lavaron con solución fría de leucina 2 mM y secados.

Una vez secos, los filtros se transfirieron a viales con 7 mL de líquido de conteo para centelleo (Aquasol[®], NEM[®] Research Products, DUPONT) y contadas en un contador de centelleo Beckman. Para fines de cálculo, se descontó los valores de captación e incorporación de las esporas recién incubadas (tiempo cero) al resto de las muestras.

2.10. Análisis mediante técnicas de microscopía electrónica.

2.10.1. Colecta y fijación de muestras.

Las muestras de esporas provenientes de medios líquidos, tanto de producción como de germinación, fueron colectadas y transferidas finalmente a tubos de eppendorff mediante centrifugación por 1 min. Posteriormente, las muestras fueron fijadas al menos 12 h a 4°C antes de ser procesadas. Como solución de fijación se utilizó glutaraldehído 3% en amortiguador cacodilato de sodio 200 mM, pH 7.4.

2.10.2. Análisis por microscopía de barrido.

Las muestras fijadas fueron traspasadas, con pipetas Pasteur, a pequeñas bolsas de papel filtro corriente y deshidratadas en batería creciente de acetona. Luego se secaron a punto crítico en una unidad Sorvall CPDS STD. El material así secado, fue espolvoreado sobre portamuestras de bronce de 10 mm de diámetro y metaladas con oro y paladio durante 3 min en una unidad Pelco 91000 SEM Sputter (Porter y Cols, 1972).

Las observaciones y micrografías fueron realizadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-25-SII, operando a 25 KV en el modo de los electrones secundarios.

2.10.3. Análisis por microscopía de transmisión.

El material fijado fue sometido a postfijación con tetroxido de osmio al 1% (p/v). Luego se deshidrataron en batería de concentración creciente de acetona e incluidas con Epon 812 (Luft, 1961). Se prepararon cortes finos (90 a 150 nm de espesor) en un ultramicrotomo (Porter-blum MT2B, Sorvall) equipado con cuchillos de diamante. Los cortes se tomaron en grillas de cobre de 300 mesh sin film y se sometieron a doble contrastado con acetato de uranilo seguido de citrato de plomo (Reynolds, 1963).

Las observaciones y micrografías se realizaron en un microscopio de transmisión Philips EM-300 operado a 80 KV.

2.10.4. Técnica de replicas mediante sombreado.

Se utilizó esta metódica para analizar la presencia de estructuras específicas en la superficie de las esporas, tal como los denominados "rodlets" (Cole and Pope, 1981). Se dispersaron muestras de esporas en pequeñas piezas de mica, las cuales fueron sombreadas con carbono y platino a 45° en un evaporador al vacío Varian PS-10E. Para limpiar las muestras y desprender las replicas de la mica, estas fueron colocadas en 50% de ácido crómico a 50°C. Las replicas fueron lavadas con agua bidestilada, cuidadosamente, usando un asa de platino transfiriéndolas varias veces a líquido fresco. Luego se montaron en grillas con film y se examinaron por microscopía de transmisión como se describe en el punto anterior.

2.11. Determinación de aminoácidos.

2.11.1. Extracción de las muestras.

Se homogenizaron muestras liofilizadas de 10 mg de esporas en mortero de porcelana con ayuda de vidrio molido. El homogeneizado fue extraído dos veces con etanol 80% en un baño de agua a ebullición durante 10 min (Hummett y Mora, 1980). Mediante centrifugación se obtuvo un extracto etanólico que, luego, se concentró hasta sequedad, al vacío y a 40°C, en un rotavapor (Büchi). El extracto seco se resuspendió en 2 mL de agua bidestilada y se eliminó la turbidez mediante microfiltración usando filtros de 0.22 μm (GV, 2.5 cm de diámetro, Millipore).

2.11.2. Obtención de la fracción aminoacídica.

Para esto, las muestras obtenidas en el punto anterior se sometieron a cromatografía de intercambio iónico (Fen y Kirk, 1981). Se utilizaron columnas, montadas en jeringas de 5 mL, las que contenían alrededor de 3 mL en volumen de resina Dowex 50W-X8 (200-400 mesh, forma protonada, Sigma). La columna se equilibró con agua y una vez pasada la muestra, se eluyó dos veces con 3 mL de solución de NH_4OH 2N. Este eluido fue secado en rotavapor como en punto precedente y luego, resuspendido en 300 μL de etanol 80%.

2.11.3. Determinación de aminoácidos mediante HPLC.

Se utilizó básicamente el sistema cromatográfico Pico•Tag® de Waters, siguiendo las recomendaciones del fabricante para el análisis de hidrolizados de proteínas conteniendo Asn, Gln y Trp (Cohen y cols., 1989). Se derivatizan 30 μL de la fracción obtenida en el punto anterior con fenilisotiocianato en la Pico•Tag Work Station. La muestra derivatizada se resuspendió en 200 μL del diluyente de muestra (95% de Na_2HPO_4 5 mM pH 7.4 y 5% de acetonitrilo) analizando, luego, 5 μL mediante cromatografía de fase reversa. Para esto, se ocupó un cromatógrafo Waters modelo 600E equipado con la columna Pico•Tag para aminoácidos libres (Nova Pak C18, 3.9x300 mm, Waters). La fase móvil consistió en dos eluyentes, A y B, con los cuales se formó un gradiente con incrementos de B a 46 °C y con flujos variables, tal como recomienda Waters para el tipo de muestra. El eluyente A consistió

de una mezcla de 940 mL de acetato de sodio 140 mM pH 6.4, conteniendo 0.05% de trietilamina, con 60 mL de acetonitrilo. El eluyente B estaba compuesto por 60% de acetonitrilo y 40% de agua. Los compuestos derivatizados fueron monitoreados en un detector Water 480 a 253 nm y las señales integradas usando un Chromatopac C-R6A (Shimadzu).

Para determinar los rendimientos de extracción en cada muestra, se adicionó hidroxiprolina (Sigma) en el momento de la homogenización. Los rendimientos estuvieron siempre sobre el 80%.

2.12. Análisis de trehalosa.

Las muestras fueron extraídas tal como se describió en el punto 2.11.1, excepto que se utilizó agua como solvente de extracción. El extracto acuoso se clarificó mediante centrifugación y fue tratado similarmente a lo descrito en el punto 8.2, pero además se pasó por una resina Dowex 1-X8 (200-400 mesh, forma de cloruro, Sigma). El líquido obtenido se concentró a sequedad en rotavapor y se resuspendió en 300 μ L de H₂SO₄ 5 mM.

La determinación de trehalosa se realizó cromatográficamente en un cromatógrafo Merk-Hitachi modelo L-6200 provisto de una columna de exclusión iónica HPX-87H de 7.8x300 mm (Aminex[®], Biorad). La fase móvil fue 5 mM de H₂SO₄ a un flujo de 0.5 mL/min y 60°C. Los compuestos eluidos se monitorearon con un detector de

índice de refracción (IRD-6A, Shimadzu) y las señales integradas con un Chromatopac C-R6A (Shimadzu).

Para determinar los rendimientos de extracción en cada muestra, se adicionó eritritol (Merck) en el momento de la homogenización. Los rendimientos estuvieron siempre sobre el 80%.

2.13. Ensayos de actividades enzimáticas.

2.13.1. Obtención de extractos enzimáticos crudos.

Usualmente alrededor de 100 mg de esporas liofilizadas fueron homogenizadas en mortero con vidrio molido y en presencia de hielo seco. El polvo obtenido se traspasó a un tubo de centrifuga y se adicionó 2 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 7.4; MgCl₂ 5 mM; glicerol 10%, EDTA 5 mM; β-mercaptoetanol 5 mM y PMSF 1 mM). Después de 1 hora de reposo, a 0°C, se centrifugó durante 30 min a 10000 x g. El líquido sobrenadante se utilizó como extracto de enzimático, el que se guardó alicuotado a -20°C.

2.13.2. Determinación de actividad glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2).

GS fue evaluada a través de su actividad de sintetasa mediante el ensayo de formación de hidroxamato (Rowe y cols., 1970). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 50 mM pH 7.4; glutamato de sodio 50 mM; hidroxilamina 25 mM; EDTA 2 mM; MgSO₄ 20 mM; β-mercaptoetanol 5 mM y ATP 10 mM. El volumen final de reacción

fue de 500 μL y se comenzó con la adición de un volumen adecuado del extracto enzimático. La reacción se detuvo, después de 20 min a 30°C, con 500 μL de una solución de FeCl_3 0.37 M, TCA 0.2 M y HCl 0.67 M. Después de 15 min en reposo, a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron y se leyó a 510 nm la absorbancia de los sobrenadantes.

Se calcularon los nmoles de γ -glutamihidroxamato, producidos en el ensayo, usando una curva de calibración preparada con γ -glutamihidroxamato (Sigma) en forma similar al ensayo. La actividad específica de la enzima se expresa como miliunidades por miligramo de proteína. Una unidad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de γ -glutamihidroxamato por min a 30°C.

2.13.3. Déterminación de la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (GDH; EC 1.4.1.4).

Esta actividad se evaluó a través de la oxidación de NADPH a 340 nm (Stewart y Moore, 1974). La mezcla de reacción contenía amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4; α -cetoglutarato 10 mM, NH_4Cl 10 mM y NADPH 0.12 mM. A excepción del último componente, la mezcla de reacción se incubó a 30 °C al menos durante 10 min. La reacción se inició con la adición de NADPH junto con un volumen adecuado del extracto enzimático. El consumo de NADPH se monitoreó durante 200 seg en un espectrofotometro Shimadzu UV-160, usando el modo cinético.

La actividad específica se expresa como el cambio en la absorbancia a 340 nm por minuto y por miligramo de proteína en el ensayo (Fincham, 1950).

2.12.4. Determinación de actividad glutamato sintasa dependiente de NADH (GOGAT; EC 1.4.7.1).

Tal actividad se evaluó a través de la oxidación de NADH a 340 nm (Boland y Benny, 1971). La mezcla de reacción contenía amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4; α -cetoglutarato 10 mM; glutamina 10 mM; β -mercaptoetanol 1% y NADH 0.1 mM. A excepción del último componente, la mezcla de reacción se incubó a 30 °C al menos durante 10 min antes de iniciarla. Para esto último, se adicionó NADH junto con un volumen adecuado del extracto enzimático. El consumo de NADH se monitoreó durante 200 seg en un espectrofotometro Shimadzu UV-160, usando el modo cinético.

La actividad específica se expresa como el cambio en la absorbancia a 340 nm por minuto y por miligramo de proteína en el ensayo.

2.14. Análisis de propiedades funcionales de las esporas.

2.14.1. Evaluación de la longevidad.

La longevidad de las esporas se evaluó a través de la resistencia de estas al almacenamiento. En este ensayo se compara la viabilidad de las esporas al momento de ser cosechadas con

respecto a la que presentan después de 7 ó 45 días de almacenamiento a 25°C y 75% de humedad (Agosin y cols., 1995). La viabilidad se determinó como la razón porcentual entre la cantidad de las esporas viables con respecto al total presente en cada muestra. Las esporas totales se cuantificaron directamente mediante recuento en una cámara de Petroff-Hausser. Las esporas viables se determinaron como las unidades formadoras de colonias (ufc) obtenidas al plaquear las muestras en placas de Petri con el medio AMLI.

2.14.2. Resistencia a la radiación ultravioleta (UV).

Las muestras de esporas se suspendieron en agua, según se describió en el punto 3.3, ajustando luego su concentración a 1×10^7 esporas/mL. Una alícuota de 5 mL de ésta suspensión se transfirió a una placa de Petri (10 cm de diámetro) y se irradió con una lámpara de luz ultravioleta (Mineralight®), CA, USA) colocada a 21 cm de altura sobre la placa. Durante la irradiación la placa fue agitada suavemente colectándose muestras a determinados tiempos. Estas muestras se plaquearon en placas de AMLI para determinar las ufc. La dosis letal 50% se determinó, gráficamente, como el tiempo en que la población irradiada disminuyó a la mitad.

2.14.3. Ensayo de hidrofobicidad de las esporas.

Las muestras de esporas, liofilizadas, se dejan caer dentro de un tubo de ensayo con agua. Se observa, luego, la capacidad de las esporas de repeler el agua y flotar en la interface líquido/aire

(muestra hidrófoba) o bien hidratarse y caer al fondo del tubo (muestra hidrofílica).

2.15. Extracción de proteínas asociadas a la pared de las esporas aéreas.

Se colocaron en tubos de eppendorff alrededor de 12 mg de esporas liofilizadas (que ocupan un volumen de 100 μ L). Las extracciones se realizaron dos veces con 500 μ l de solvente cada vez. Cada extracción se realizó mediante 3 ciclos de un 1 min de agitación en un vortex, con 1 min de reposo en hielo cada vez. En cada extracción, se obtuvo el líquido sobrenadante mediante 5 minutos de centrifugación a 12000 x g. Se juntaron los sobrenadantes y se llevaron a sequedad por centrifugación al vacío (Savant) o bien por liofilización. En algunas oportunidades, se midió la cantidad de proteínas extraídas antes de secar.

Cuando el solvente fue ácido trifluoroacético (TFA) 100%, la extracción se realizó solo una vez con 500 μ L. El líquido sobrenadante se llevó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno en una campana de extracción.

Cuando se utilizó SDS, la extracción se realizó una vez con 1 mL de una solución de SDS al 1% que estaba a ebullición en un baño de agua. Se agitó brevemente, en vortex, y se dejó enfriar a temperatura ambiente, agitando nuevamente una vez frío. La

muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se dejaron precipitando toda la noche a 0°C con 7% de TCA final.

Los residuos de cada extracción se resuspendieron en 120 μ L de LSB (Laemli's sample buffer; Laemli, 1970) y se sometieron a 5 min de ebullición en un baño de agua. Una vez frios se centrifugaron por 5 min. El sobrenadante fue utilizado en los análisis siguientes.

2.16. Extracción de las proteínas presentes en los medios de cultivo líquidos.

Una muestra de 40 mL de medio cultivo fue procesado según el punto 2.5.3, excepto que la centrifugación fue a 20000 x g. El sobrenadante obtenido fue precipitado toda la noche a 0°C con 7% de TCA. Las proteínas precipitadas se colectaron mediante centrifugación (30 min a 20000g y 4°C) y se resuspendieron en 200 μ L de LSB. Estas muestras se sometieron a ebullición como se describió en el punto anterior.

2.17. Extracción de proteínas de micelio aéreo no esporulante.

Las muestras de micelio aéreo, obtenidas según el punto 2.6, se liofilizaron y luego se homogenizaron en mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se traspasó a un tubo de eppendorf (que ocupó un volumen de 100 μ L) y se resuspendió en 1 mL de

amortiguador B (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, SDS 2 %, NaN₃ 0,02 % y 1 mM PMSF). Se agitó en un vortex, se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente y se volvió a agitar. Esta extracción se repitió dos veces. El micelio así extraído fue sometido, después, a una extracción con SDS 1% caliente. El micelio remanente fue lavado dos veces con agua destilada, mediante centrifugación, para eliminar el detergente. Finalmente, el micelio fue sometido a una extracción con TFA 100%. Las extracciones con SDS y TFA se realizaron según se describe en el punto 2.15.

Alternativamente el micelio homogenizado fue extraído directamente con etanol 60 % o con una mezcla de acetonitrilo y TFA, 20 % y 0.1%, respectivamente (ACN/TFA).

2.18. Análisis electroforéticos de proteínas bajo condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE).

Se sembraron 30 μ L de muestra en un gel de poliacrilamida en presencia de 0.1% SDS (Laemli, 1970). Se utilizaron minigeles en placas (10x10x0.15 cm), preparados con un gel concentrador al 4.5% de poliacrilamida, mientras que para la separación se empleó uno al 18%. La electroforesis se realizó, a corriente constante y temperatura ambiente, a 12 mA durante la concentración y 24 mA durante la separación. La corrida se detuvo 10 min después que el colorante, del frente de migración, había salido del gel separador.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron fijadas por 15 min en isopropanol 50% y TCA 10%. Luego fueron teñidas por 1h en isopropanol 25%, TCA 10% y 0.1% de azul de Coomassie R-250. El gel se destiñó mediante lavados sucesivos con ácido acético 7% y 10% de metanol.

2.19. Detección de proteínas mediante la técnica de Western.

Una vez que las proteínas fueron separadas en la electroforesis, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (MFS) usando el equipo Transblot (BioRad) a 300 mA por 3 h. Una vez transferidas, las proteínas fueron teñidas en la membrana con una solución del colorante Ponceau S 0.2% en TCA 3%, para verificar tanto la transferencia como para ubicar la posición de los marcadores de masa molecular. Luego, la membrana fue incubada con BSA al 3% en amortiguador TBST (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y Tween 20 0.05%) para bloquear los sitios de unión inespecíficas.

Posteriormente, la membrana fue incubada durante 1 h con el anticuerpo policlonal preparado en conejo contra la hidrofobina HFB1 de *T. reesei* (gentilmente proporcionado por la Dra. Merja Penttilä, Biotechnology and Food Research, VTT, Finlandia), diluido 1/3000 en TBST. La membrana se lavó tres veces por 10 min con TBST y se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo,

preparado en cabra (BioRad) y conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1/1000 en TBST. Luego de una incubación de 30 min la membrana se volvió a lavar con TBST 3 veces por 10 min.

Las bandas de proteína que reaccionaron con los anticuerpos fueron reveladas con el método de desarrollo de color de Promega. Este contenía NBT (azul de nitrotetrazolio) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) en Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM.

2.20. Cuantificación de proteínas.

Las proteínas solubles fueron determinadas usando una modificación del método de Lowry (Tan y cols., 1984). Se utilizó BSA (Sigma, fracción V) como estándar de calibración del método.

2.21. Análisis de ácidos nucleicos de *T. harzianum*.

2.21.1. Análisis de DNA.

2.21.1.a. Purificación de DNA genómico.

Se cultivó el hongo por 24 h en medio malta levadura (MML, extracto de malta 2%, extracto de levadura 0.2%). El micelio fue cosechado mediante filtración sobre lana de vidrio, lavado con agua estéril, congelado a -70°C y finalmente liofilizado.

La purificación del DNA genómico se realizó según describieron Bainbridge y cols. (1990). Para esto, el micelio liofilizado se homogenizó en mortero de porcelana con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se resuspendió en la solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 250 mM pH8, proteinasa K 250 µg/mL y Triton X-100 0.5 %). Esta suspensión se incubó toda la noche a 37°C, con agitación suave. Posteriormente se realizaron extracciones con fenol-cloroformo y tratamientos con RNAsa. Finalmente, el DNA se precipitó con 0.54 volúmenes de isopropanol y se extrajo con una pipeta Pasteur estéril. El DNA se lavó con etanol 70% frío, se secó mediante centrifugación al vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0) durante una noche.

2.21.1.b. Cuantificación del DNA.

Para determinar el tamaño, cantidad y la integridad del DNA tanto genómico como plasmidial y fragmentos, este fue analizado electroforéticamente en geles de agarosa con amortiguador TBE (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM y EDTA 1 mM pH 8.0), según se describe en Sambrook y cols (1989). La bandas de DNA se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

El DNA genómico, además, fue cuantificado mediante la absorbancia a 260 nm y su pureza mediante la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm (Sambrook y cols., 1989).

2.21.1.c. Análisis mediante la técnica de Southern.

Alicuotas de DNA genómico que contenían 2 μg de DNA fueron incubados con 20 unidades de las enzimas de restricción en un volumen final de 30 μL . La reacción se detuvo con 7.5 μL del amortiguador de carga cinco veces concentrado (Sambrook y cols., 1989). El DNA digerido fue fraccionado mediante electroforésis en agarosa al 0.8% con TBE, tal como se describe en el punto precedente. Luego, el DNA se transfirió capilarmente a membranas de nylon Magna Charge (MSI, Westboro, MA, USA). El tratamiento previo del gel, la transferencia del DNA, y la posterior manipulación de la membrana se realizaron según recomienda el fabricante.

Cuando se utilizó *hfb2* como sonda las condiciones de hibridización fueron moderadamente estrictas. Para esto, la membrana fue incubada en 10 mL de una solución que contenía (por ml): formamida desionizada 50%, solución de Denhardt's 10x, SSC 6x, SDS 0.5 %, DNA denaturado de esperma de salmón 100 μg y poliA DNA 10 μg (para detalles de los componentes mencionados ver Sambrook y cols., 1989). Después de 1 h de prehibridización se agregó la sonda marcada con ^{32}P (ver punto 2.22.) y desnaturada en un volumen de 1 mL de la solución anterior. La sonda se agregó a una concentración final de 0.5×10^6 cpm/mL. Después 16 h de hibridización con la sonda, la membrana fue lavada en soluciones con decreciente concentración de SSC: 3x, 1x y finalmente 0.2x, siempre en presencia de SDS 0.1%. Los lavados se realizaron dos

veces con cada solución por 15 min y con agitación. La temperatura fue siempre mantenida a 42 °C.

Cuando se utilizó el inserto del clon p3cL2a como sonda, las condiciones fueron más estrictas. Para la prehibridación e hibridación las membranas se incubaron en 10 mL de una solución que contenía (por mL): formamida desionizada 50%, solución de Denhardt's 5x, SSC 5x, SDS 0.1 %, DNA denaturado de esperma de salmón 100 µg y poliA DNA 1 µg. Los lavados se realizaron con 2 x SSC; 0.1% SDS por 15 min a temperatura ambiente, luego en 0.1 x SSC; 0.1% SDS a 65 °C por 30 min.

Para la exposición autoradiográfica, las membranas se colocaron dentro de bolsas plásticas, humedecidas en la última solución de lavado, y selladas. Las membranas se colocaron, luego, sobre un film X-OMAT-AR (Kodak, Diagnostic Film) dentro de un cassette de exposición con pantalla intensificadora. Posteriormente, el cassette se dejó a -70°C durante el tiempo adecuado para apreciar las bandas de hibridación con óptima intensidad, después del revelado de los films como indica el fabricante.

2.21.2. Análisis de RNA.

2.21.2.a. Purificación de RNA total.

El micelio se colectó desde medios líquidos mediante filtración sobre una malla sintética de 40 mesh, que permitió el paso de esporas, reteniendo el micelio. Este último, fue luego lavado con

agua estéril y congelado a -70. Para extraer el RNA total, el micelio fue molido en mortero de porcelana en presencia de nitrógeno líquido. El polvo obtenido se suspendió en una solución desnaturante a base de isotiocianato de guanidina y posterior centrifugación en gradiente de CsCl, como ha sido previamente descrito por Chirwing y cols. (1979). Alternativamente, cuando se disponía de poca biomasa, el micelio molido se sometió al protocolo de extracción del sistema RNeasy™ (QIAGEN GmbH).

2.21.2.b. Cuantificación del RNA.

La cuantificación del RNA se realizó mediante la absorbancia a 260 nm y su pureza mediante la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm (Sambrook y cols., 1989). Para verificar la pureza y la integridad del RNA, 2 µg de RNA fueron glioxilados y luego fraccionados electroforéticamente en geles de agarosa al 1% con amortiguador fosfato de sodio 10 mM pH 7.4. Las bandas de RNA se visualizaron mediante tinción con naranja de acridina (Sambrook y cols., 1989).

2.21.2. c. Análisis mediante la técnica de Northern.

El RNA fraccionado según el punto precedente, se transfirió capilarmente a membranas de nylon Magna Charge (MSI, Westboro, Ma, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las membranas se prehibridizaron por 2 h a 42°C en 10 mL de una solución que contenía: formamida desionizada 50%, sulfato de dextrano 10%, SDS 1%, NaCl 1 M, y DNA denaturado de esperma de salmón 125 mg/mL. Posteriormente, las muestras fueron hibridizadas con el fragmento correspondiente al cDNA del gen clonado de *T. harzianum* homólogo a *hfb2*. Este fragmento fue marcado con ³²P según el punto 2.22 y se agregó a la solución anterior una concentración final de 0.5 a 1 x 10⁶ cpm/mL e incubando durante 16h. Luego, las membranas fueron lavadas bajo condiciones de alta estrictez, para lo cual se disminuyó la concentración de SSPE en las soluciones de lavado: 5x, 1x y 0.2x, las que contenían SDS al 0.1%. Tales lavados se realizaron dos veces con cada solución por 15 min a 42°C. Finalmente, se las membranas se lavaron dos veces con la última solución descrita pero a 68°C. Después, las membranas se procesaron para exposición autoradiografica como se describió en el punto 2.21.1.c.

2.22. Obtención de sondas marcadas con ³²P.

Las sondas correspondientes al gen *hfb2* y al fragmento clonado p3cL2a se obtuvieron mediante doble digestión con Xho I y EcoR I de los plasmidios que los contenían, ambos derivados del fagemido pBluescrip SK(-) (Stratagene). Los fragmentos se recuperaron desde geles de agarosa al 0.8% en TBE, donde se habían separado los productos de la digestión, utilizando el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH).

Para las marcaciones se utilizó el sistema Random Primed DNA Labelling Kit (Boehringer Mannheim). Usualmente, 50 ng de DNA se marcaron con 50 μ Ci de [α - 32 P]CTP (Amersham) bajo las condiciones estándar que recomienda el manufacturador. La sonda marcada fue purificada cromatográficamente en columnas Quick Spin™ (Pharmacia) tal como recomienda el fabricante. La actividad específica de las sondas obtenidas fue usualmente mayor a 0.5×10^8 cpm/ μ g DNA.

2.23. Clonamiento de hidrofobinas de *T. harzianum* expresadas durante la esporulación.

2.23.1. Construcción de genoteca de cDNA.

Se aisló la fracción poli(A)⁺ del RNA total extraído del micelio cultivado durante 72 h en MLE. Esto se realizó utilizando una columna de celulosa-oligo(dT), según se describe en Sambrook y cols. (1989).

El banco genético de cDNA se construyó a partir de 5 μ g del RNA poliadenilado, los que fueron ligados en la orientación 5'→3' en el vector Uni-ZAP™ XR, derivado del fago λ , de acuerdo a las instrucciones del manufacturador (Stratagene).

Utilizando placas con el medio LAM y la cepa XL1-Blue MRF' de *E. coli* como huésped, tal como indica el fabricante, la genoteca obtenida fue amplificada, titulada y finalmente el porcentaje de recombinantes determinada mediante la selección de color IPTG-X-gal.

2.23.2. Selección y purificación de clones.

La selección de los clones que poseían un inserto correspondiente al cDNA de un gen de hidrofobina, se realizó mediante hibridización heteróloga usando *hfb2* como sonda. Para esto, la genoteca obtenida fue plaqueda en placas de Petri, grandes, con el medio LAM como describe el manufacturador obteniendo aproximadamente 50000 placas de lisis por placa de Petri. El DNA de las placas de lisis, se transfirió a filtros de nitrocelulosa según describe Sambrook y cols. (1989). Las hibridizaciones con la sonda se realizaron según se detalló en el punto 2.21.1.c. Se aislaron los fagos de las placas de lisis que dieron señal positiva. Estos fueron plaqueados, nuevamente, para una segunda selección. En esta se aseguró la de obtención de placas de lisis separadas, permitiendo aislar el clon puro.

Los clones así obtenidos fueron subclonados mediante una excisión *in vivo* del fagemido pBluescrip desde el fago vector derivado de λ . Esto se realizó, tal como lo recomienda el fabricante, mediante un doble infección de la cepa SOLR de *E. coli* con el fago purificado y el fago ExAssist™. El último fago no puede replicarse en la cepa huésped, pero permite sintetizar y circularizar el plasmidio pBluescrip SK(-) contenido en el vector Uni-ZAP™ XR, dentro del cual se encuentra el inserto clonado. Estos últimos, son liberados del plasmidio mediante doble digestión con EcoR I y Xho I y sus tamaños determinados mediante geles de agarosa al 0.8 % en TBE, tal como se describió en el punto 2.21.1 b.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de factores relacionados con la adhesión de las esporas aéreas de *T. harzianum*.

3.1.1. Caracterización de la conidiogénesis aérea.

3.1.1.a. Inducción de la esporulación.

La esporulación en la cepa P1 no es fotoinducible. Sin embargo, en presencia del detergente Igepal (medio AMLI) se restringe el crecimiento del hongo, observándose una particular forma de esporulación. Como se aprecia en la Figura 7, a medida que el hongo coloniza el medio AMLI, se producen anillos de esporulación en forma sincrónica e independiente de la luz. La biomasa de los anillos casi no contiene micelio, permitiendo coleccionar fácilmente las esporas desde los anillos.

3.1.1.b. Evolución morfológica durante la esporulación.

Bajo las condiciones anteriores se distinguen, al menos, 4 estados diferenciables mediante el color de los anillos. Como se indica en la Tabla 2, los anillos son inicialmente blancos, tornándose luego amarillos y finalmente verdes. En todos estos estados se aprecian esporas (Figura 8), las que van sufriendo transformaciones morfológicas, como el aumento de tamaño (Tabla 2), traspaso de material desde la fiálide (Figura 9A y B) y acumulación de cuerpos electrodensos (Figura 8C y D y Figura 9C).

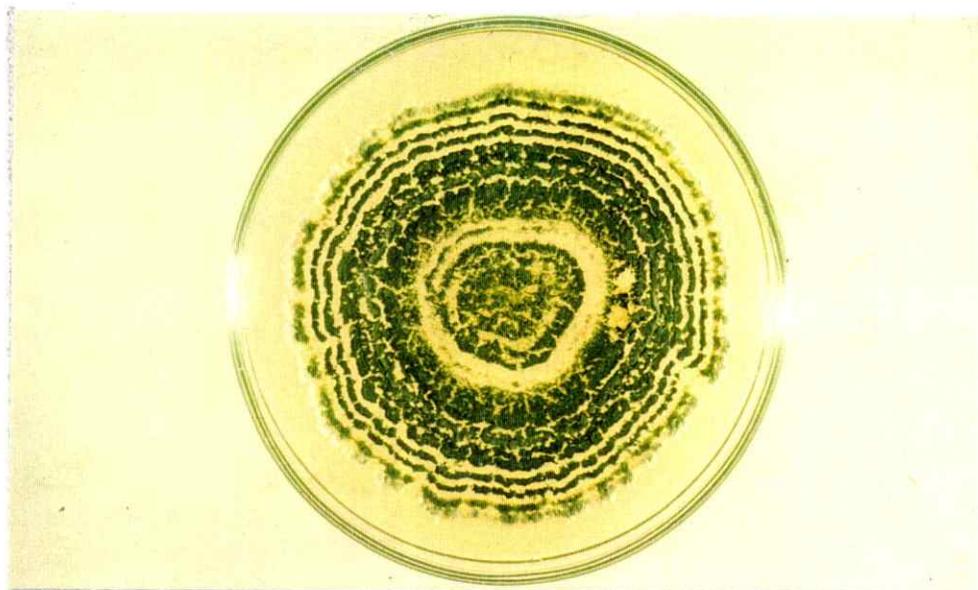


Figura 7. Desarrollo de la esporulación aérea de la cepa P1 de *T. harzianum* en el medio AMLI.

Tabla 2
 Características de los diferentes estados de la esporulación
 aérea de *T. harzianum* (1).

Estado	Color	Diámetro espora (μm)	Grosor de la pared	
			W1 (nm)	W2 (nm)
1	Blanco	1.2	0	90
2	Amarillo	2.5	31	31
3	Verde claro	2.6	33	66
4	Verde Oscuro	2.4	118	119

(1) Datos de Figuras 7 y 8.

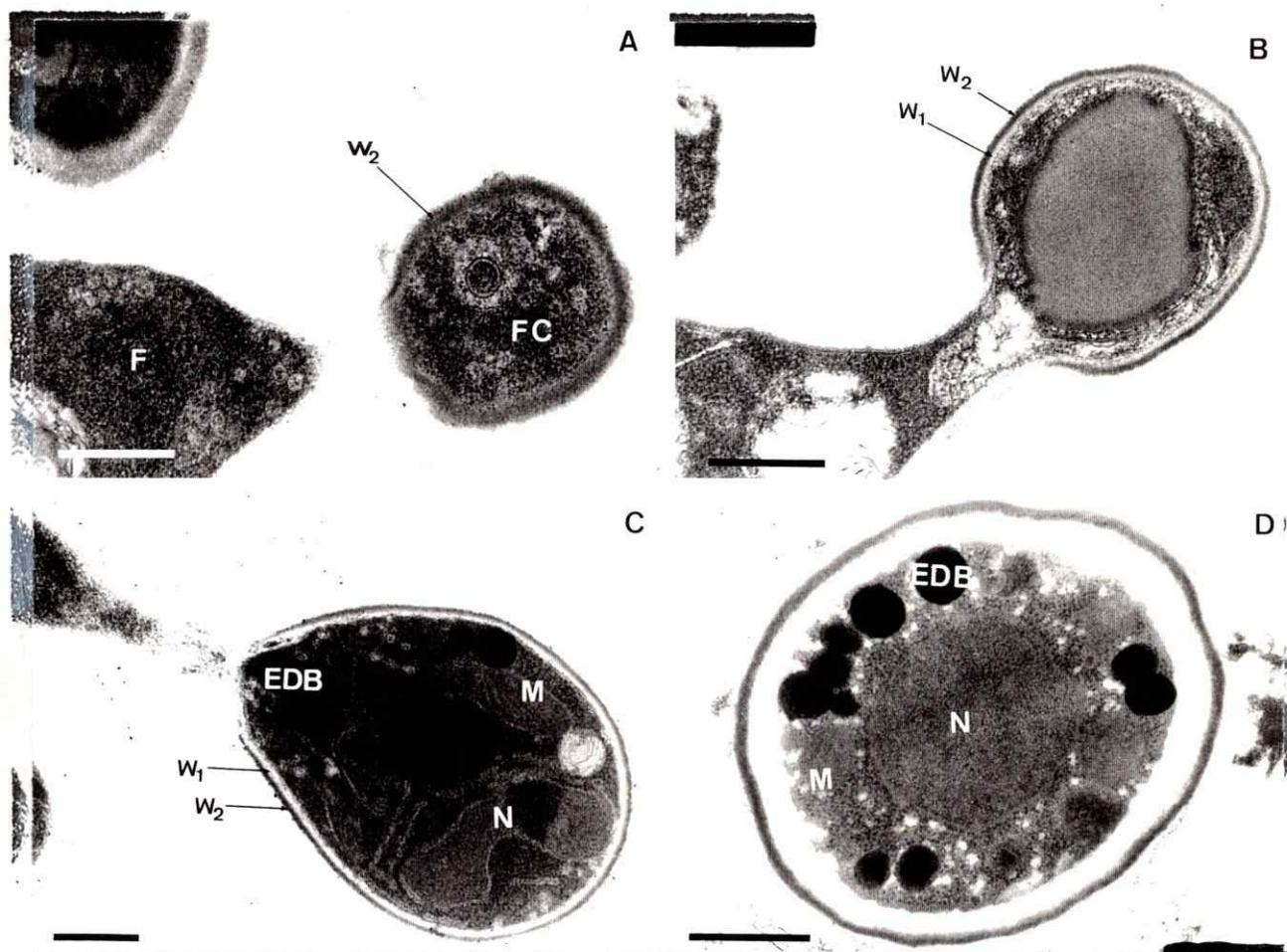


Figura 8. Evolución ultraestructural observada durante la esporulación aérea de *T. harzianum*. A, esporas presentes en anillos blancos; B y C, anillos amarillos; D, anillos verdes.

Simbolos : F, fialide; FC, fialoconidia; W₁ y W₂, pared interna y externa respectivamente; EDB; cuerpos electrodensos; N, núcleo; M, mitocondria. La barra representa 0.5 μm

Es notable el desarrollo diferencial de las capas que componen la pared de la espora. En efecto, se observó que la pared está formada por dos capas: una externa (W_2) particularmente electrodensa y una interna (W_1) electrotransparente. Durante la ontogenia de la espora aérea, la pared externa se desarrolla primero, mientras que la interna aparece en estados posteriores (Tabla 2, Figura 8).

3.1.2. Propiedades diferenciales entre las esporas aéreas y sumergidas.

3.1.2.a. Análisis mediante microscopía de barrido.

Como se puede apreciar en la Figura 9A, las esporas aéreas son producidas en aglomerados. La superficie se observa lisa, pero cubierta por un material extracelular, el cual además, se extiende "como tela de araña" sobre varias células a la vez. Estas células tienen una forma aparentemente ovoide con un diámetro que oscila entre los 2.3 y 2.6 μm . Las esporas provenientes de medios líquidos, en cambio, se presentaron generalmente colapsadas, no agregadas y sin ningún material extracelular (Figura 9B). Su diámetro fue ligeramente mayor al de las esporas aéreas (35%).

3.1.2.b. Análisis mediante microscopía de transmisión.

Como se aprecia en la Figura 9C, las esporas aéreas presentan un citoplasma bastante denso y la membrana citoplasmática invaginada. Llama la atención la casi ausencia de organelos, distinguiéndose solo la presencia de cuerpos electrodensos (EDB) y mitocondrias. Estas últimas, presentan una tinción anómala, como "en negativo" (Figura 9C). Estos resultados sugieren que las esporas aéreas se encontrarían en un estado metabólico reducido.

Las esporas sumergidas, a su vez, presentan un aspecto similar al de una célula metabólicamente activa. En efecto, el citoplasma se aprecia menos denso y granulado, probablemente por la presencia de ribosomas (Figura 9D). Se observan, además, vacuolas conteniendo material electrodenso, que aparentemente estarían en degradación y un alto número de mitocondrias con tinción "normal".

Otro aspecto notable que diferencia ambos tipos de esporas fue el grosor de la pared externa. En efecto, en las esporas sumergidas la capa W_2 está reducida alrededor de cuatro veces con respecto a las aéreas (Figura 9 C y D; Tabla 3).

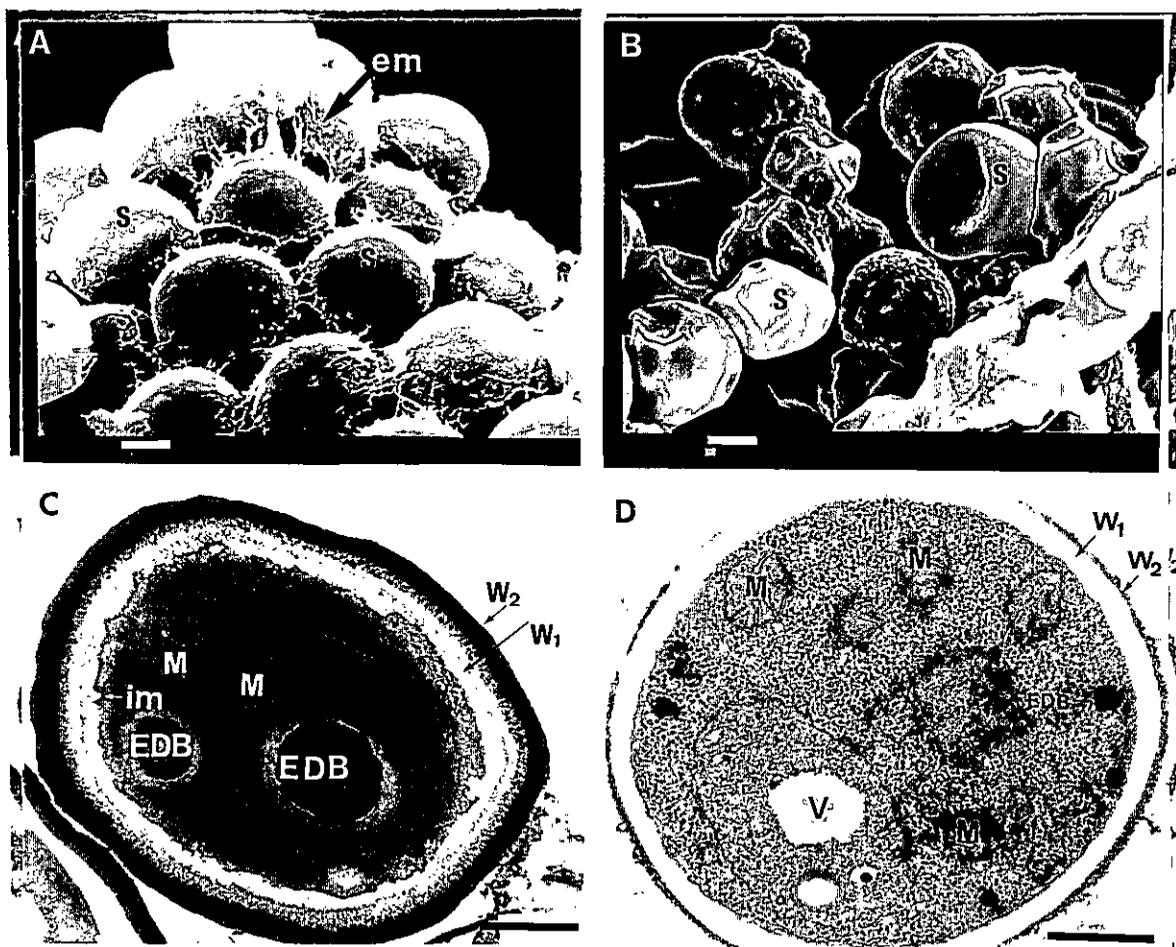


Figura 9. Aspecto de las esporas aéreas y sumergidas de *T. harzianum* mediante microscopía electrónica. Las esporas sumergidas (B y D) fueron producidas mediante 96 h de cultivo en MLE, mientras que las esporas aéreas (A y C) en AMLI. Ambos tipos de esporas fueron preparadas para observación por microscopía electrónica de barrido (A y B) y transmisión (C y D).

Simbolos : S, espora; em, material extracelular; EDB, cuerpos electrodensos; W_1 y W_2 , pared interna y externa respectivamente; M, mitocondria; V, vacuola; im, invaginación de membrana. Las barras representan $1\ \mu\text{m}$ (A y B) y $0.5\ \mu\text{m}$ (C y D).

3.1.2.c. Características funcionales.

Las esporas aéreas son más longevas y resisten significativamente mejor exposiciones a la radiación UV (Tabla 3). En efecto, todas las esporas aéreas son viables luego de 45 días de almacenamiento a altas humedades, mientras que la viabilidad de las esporas sumergidas cae en un 85%. Además, las esporas aéreas son capaces de resistir casi el doble de tiempo la exposición a radiación ultravioleta que las sumergidas.

Por otro lado, las esporas aéreas presentaron un marcado carácter hidrofóbico, mientras que las sumergidas son totalmente hidrofílicas. De hecho, cuando estas últimas son colocadas en agua, se humedecen rápidamente cayendo hacia el fondo del tubo (Figura 10). En este ensayo, las esporas aéreas repelen el agua y pueden permanecer flotando al menos 5 días. Durante este tiempo, solo una pequeña fracción cae al fondo del tubo.

3.1.3.d. Características bioquímicas.

Se intentó correlacionar la diferente longevidad de las esporas con el contenido endógeno de trehalosa. Paradojalmente, este disácarido se encuentra en una concentración casi dos veces superior en las esporas sumergidas con respecto a las aéreas (Tabla 3).

Tabla 3.
Propiedades de las esporas de *T. harzianum* producidas
por micelio aéreo y sumergido.

Propiedad	Tipo de esporas	
	Aéreas ⁽¹⁾	Sumergidas ⁽²⁾
Resistencia a radiación UV (LD ₅₀ , min)	4.0	2.4
Longevidad ⁽³⁾ (%)	95.0	15.0
Contenido de trehalosa (mg/g)	30	56
Hidrofobicidad ⁽⁴⁾	+	-
Captación del colorante azul de lactofenol	-	+
Grosor de la Pared (nm) ⁽⁵⁾		
W ₁	119	30
W ₂	116	150
Grosor total	237	180

(1) Obtenidas desde placas de Petri con el medio AMLI

(2) Colectadas 24 h después del máximo de producción en el medio MLE.

(3) % de ufc determinadas después de 45 días de almacenamiento a 25°C y 75% de HR.

(4) Resultados de la Figura 10.

(5) Resultados de la Figura 9.

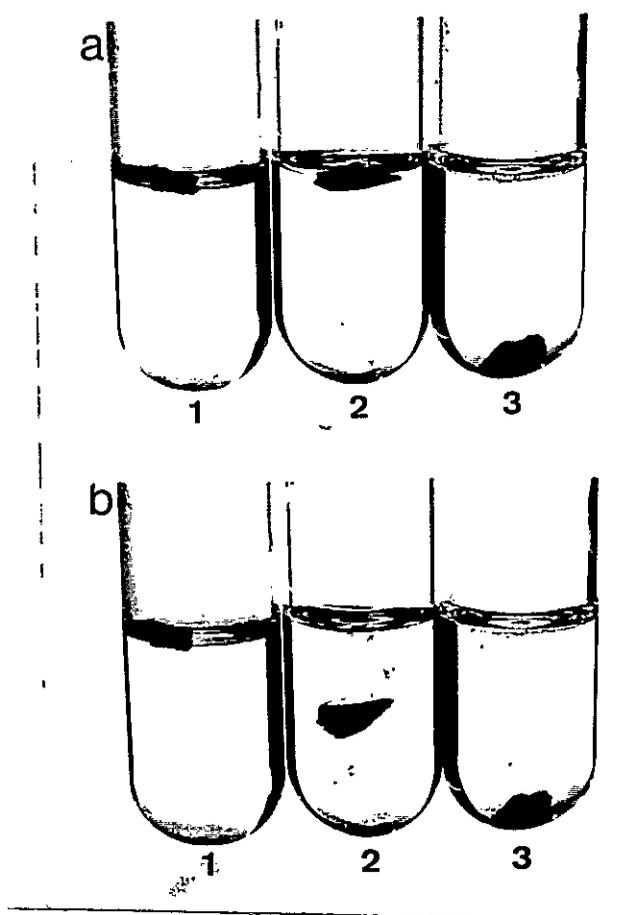


Figura 10. Evaluación de la hidrofobicidad de esporas de *T. harzianum*. Las muestras de esporas liofilizadas fueron colocadas en la interface líquido/aire en un tubo de ensayo con agua. Se aplicaron esporas producidas por micelio aéreo sin tratamiento previo (1), o bien después de una homogenización en agua (2), así como también aquellas producidas bajo condiciones de cultivo líquido (3). La fotografías se tomaron 5 min (a) y 20 min (b) después de la aplicación.

Por otro lado, los perfiles electroforéticos de las proteínas totales fue diferente para ambos tipos de esporas (Figura 11). Dos bandas de proteína, con masas moleculares de 43 y 29 kDa, se observaron específicamente en las esporas sumergidas, mientras que una de 50 kDa está presente en altos niveles en las aéreas. Proteínas con masas moleculares de 29, 68 y 100 kDa, se encontraron en ambos tipos de esporas. Ninguna de estas proteínas ha sido identificada hasta el momento.

3.1.4. Naturaleza de los factores responsables del carácter hidrofóbico de las esporas aéreas.

3.1.4.a. Efecto de la solubilización de componentes de la pared externa de la espora.

Debido al carácter hidrofóbico de las esporas aéreas, la única manera de obtener una suspensión homogénea de estas células es utilizando un homogenizador de vidrio con vástago de teflón o bien agitando a alta velocidad en vortéx por largo tiempo. Al realizar el ensayo de flotabilidad con las esporas resultantes de este tratamiento, se encontró que perdían su carácter hidrofóbico (Figura 10). Similar comportamiento ocurrió a suspender las esporas en solventes menos polares como etanol (60% y absoluto) o acetonitrilo 40%. En este caso, sin embargo, las esporas se suspendieron más fácilmente (no mostrado). La pérdida de la

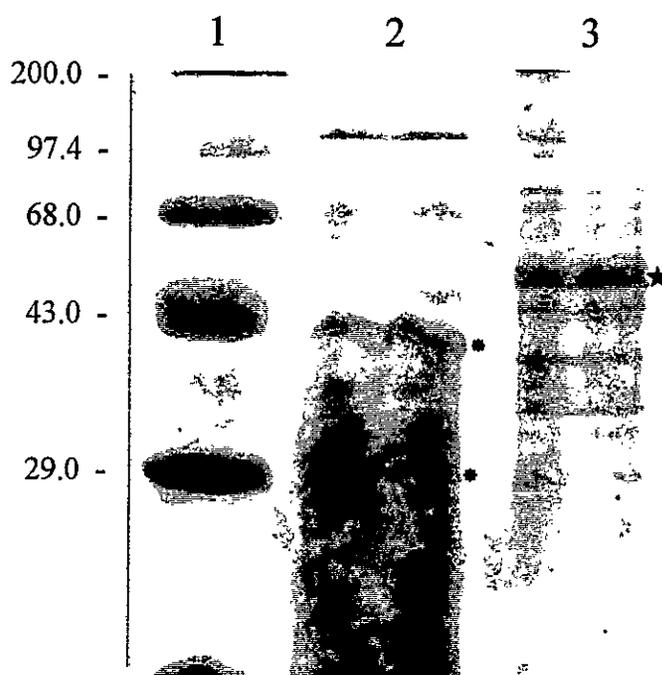


Figura 11. Análisis electroforético de las proteínas totales de esporas aéreas y sumergidas. Las esporas aéreas (3) y sumergidas (2) fueron homogenizadas en mortero con vidrio molido y las proteínas extraídas directamente con el amortiguador de muestra, LSB, y calentadas por 5 min a 100 °C. La separación se realizó mediante SDS-PAGE con 12% de poliacrilamida, el cual se tiñó con azul de Coomasie. En el carril 1 se muestra la migración de los marcadores de masa molecular, indicados en kDa. *, indican proteínas de 43 y 29 kDa específicas de las esporas sumergidas; ★, indican la proteína de 50 kDa específica de las aéreas.

hidrofobicidad no se observó al suspender las esporas en cloroformo, indicando la mediación de componentes solubles tanto en agua como en solventes menos polares.

Según el solvente utilizado en los tratamientos anteriores, se liberan diferentes cantidades de proteínas. En efecto, la mitad de las proteínas totales de la spora se extrajeron en agua o agua seguido de SDS 1% caliente. Al utilizar solventes de mediana polaridad (etanol 60% o acetonitrilo 40%) se extraen alrededor del 25% de las proteínas totales (no mostrado).

Mediante análisis de microscopía de transmisión, se encontró que la pared externa se reduce en un 30% en las esporas extraídas exhaustivamente con agua (cuatro veces). Si las esporas son luego extraídas con SDS 1% caliente, el grosor se reduce en otro 30% (no mostrado).

3.1.4.b. Presencia de estructuras tipo rodlets en la superficie de las esporas aéreas de *T. harzianum*.

Se intentó relacionar la hidrofobicidad de las esporas aéreas con la presencia de tales estructuras. Para esto, se prepararon réplicas de la superficie de las esporas utilizando la técnica de sombreado con carbono y platino. La observación mediante microscopía de transmisión de tales muestras no evidenció la presencia de las estructuras esperadas. La superficie de las esporas

aéreas se observó más bien lisa. En el caso de las esporas sumergidas, ésta aparece más irregular (no mostrado).

3.1.5. Detección de proteínas tipo hidrofobinas en las esporas aéreas de *T. harzianum*.

Las esporas fueron extraídas con la solución ACN/TFA, que permite extraer selectivamente HFB1 y HFB2 de *T. reesei*. El perfil electroforético de las proteínas extraídas fue más heterogéneo para el caso de *T. harzianum* (Figura 12A). Las bandas cuantitativamente importantes, según la tinción de Coomassie, reaccionaron con el anticuerpo antiHFB1 (Figura 12B). La inmunoreactividad fue consistente para las proteínas de masas moleculares de 18, 10 y 8 kDa (Figura 12B), de aquí en adelante denominadas como P18, P10 y P8. Notablemente, P18 presentó una reacción mucho más fuerte con el anticuerpo que las demás proteínas, incluyendo a aquellas de *T. reesei*.

La movilidad electroforética de las tres bandas anteriores no fue alterada al resuspender en TFA 100% el extracto anterior (no mostrado). Esto sugiere que P18 no corresponde a una forma dimérica de alguna de las proteínas de menor masa molecular.

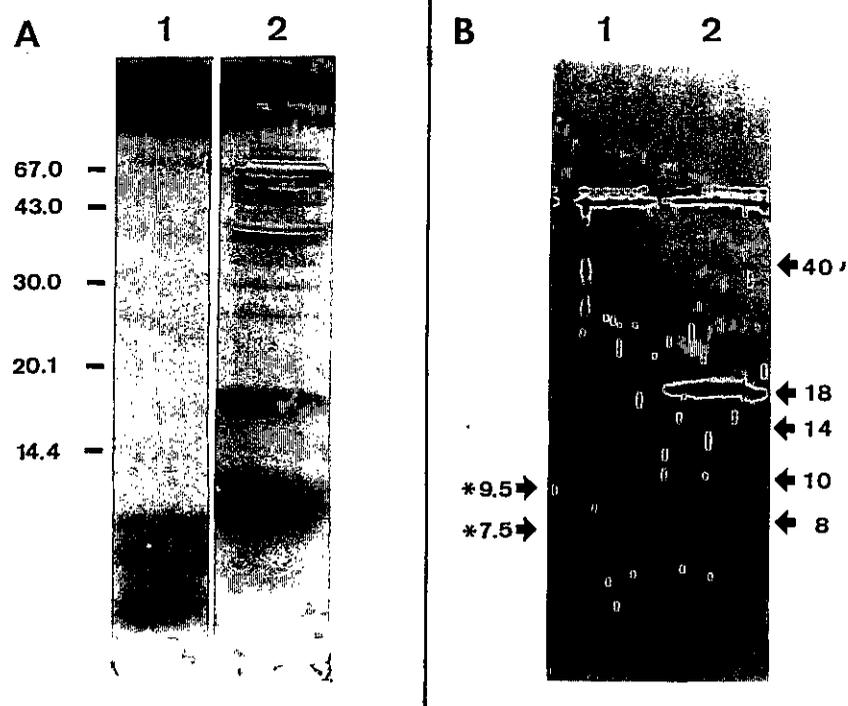


Figura 12. Extracción de putativas hidrofobinas de esporas aéreas de *T. harzianum*. Las proteínas asociadas a la pared de las esporas aéreas de *T. reesei* QM9414 (1) y *T. harzianum* P1 (2) fueron extraídas con ACN/TFA y luego analizadas mediante SDS-PAGE con 18% de poliacrilamida. Las proteínas se sometieron a tinción con azul de Coomassie (A) y se evaluó su reacción con anticuerpos, preparados contra HFB1 mediante la técnica de Western (B). En A, se indica la migración de los marcadores de masa molecular y en B, la masa molecular de las especies inmunoreactivas. Ambas se expresan en KDa. *, indican los péptidos que coinciden con el producto codificado por el gen *hfb2* de *T. reesei*

Las dos bandas inmunoreactivas de alta masa molecular que se observan para las muestras de *T. reesei* y *T. harzianum* (Figura 12A), es un artefacto. Esta reacción no tienen relación con las hidrofobinas, debido a que se manifiesta incluso en carriles donde no se ha cargado muestra.

3.1.5.a. Caracterización de la extracción de P18, P10 y P8.

Como se muestra en la Figura 13, estas proteínas no fueron solubilizadas con 100% de TFA previa extracción con SDS caliente (Figura 13, carriles 1 a 3), por lo que no pueden ser clasificadas como hidrofobinas de clase I. Se extrajeron, en cambio, directamente de la espora en una amplia gama de solventes (Figura 13, carriles 4 a 8). La extracción con agua y etanol 60% las asemejan a las hidrofobinas de clase II.

Realizando extracciones secuenciales de las esporas aéreas de *T. harzianum*, se encontró que después de utilizar como primer solvente agua, acetonitrilo 40% o etanol 60%, siempre era posible volver a extraer las proteínas con SDS 1% caliente o ACN/TFA como segundo solvente (no mostrado). Esto sugirió que tales proteínas podrían encontrarse bajo dos formas o fracciones de distinta naturaleza o asociación con la espora. Para confirmar esto, se realizaron extracciones exhaustivas como se muestra en la Figura 14. Después de extraer totalmente las proteínas con cualquiera de los solventes anteriores (Figura 14, carril 1 y 2), una fracción

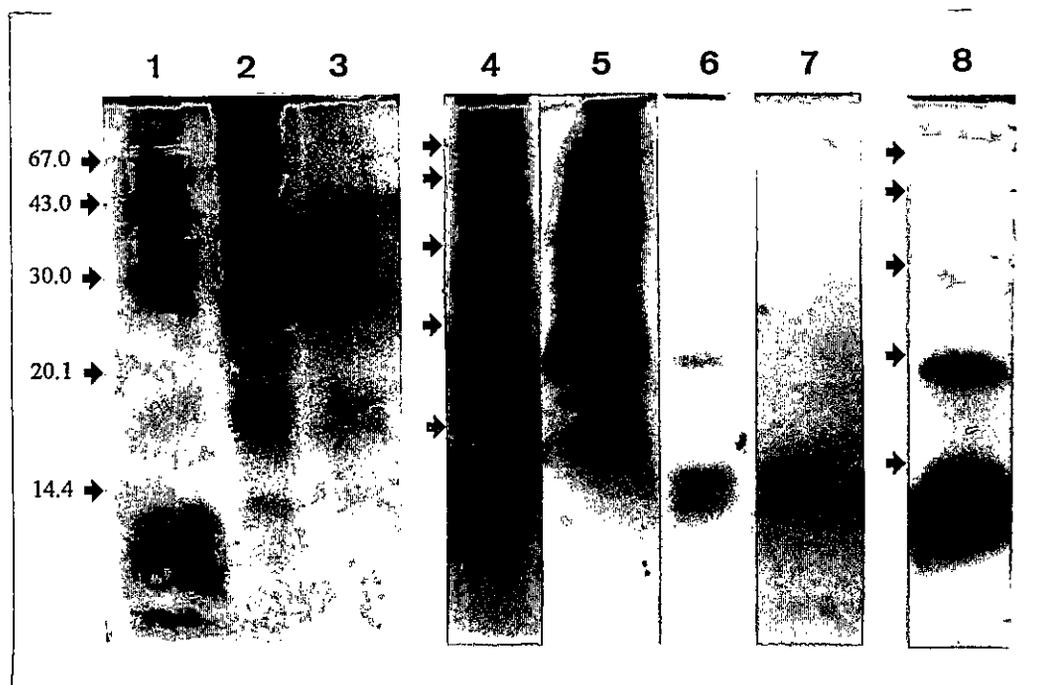


Figura 13. Efecto de diferentes condiciones de extracción sobre la solubilización de P18, P10 y P8 de esporas aéreas de *T. harzianum*. Las proteínas asociadas a la pared de las esporas aéreas se extrajeron secuencialmente con agua (1), seguido de SDS 1% caliente (2) y luego TFA 100% (3). O bien con extracciones directas en SDS 1% caliente (4), TFA 100% (5), etanol 60% (6), etanol absoluto (7) y acetonitrilo 20% (8). Las proteínas se analizaron mediante PAGE-SDS con 18% de poliacrilamida seguido de tinción con azul de Coomassie.

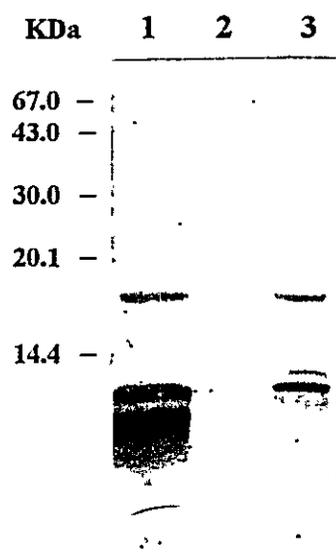


Figura 14. Determinación de dos fracciones de proteínas tipo hidrofobinas diferentes asociadas a las esporas aéreas de *T. harzianum*. 1, Las esporas fueron extraídas 6 veces seguidas con etanol 60%. 2, Extracción con etanol 60% después de (1). 3, extracción con ACN/TFA después de (2). Las proteínas se analizaron en SDS-PAGE con 18% poliacrilamida seguido de tinción con azul de Coomassie.

permaneció resistente. La fracción remanente fue extraída con un tratamiento más drástico, como ACN/TFA o SDS 1% caliente (Figura 14, carril 3). Esto confirmó que P18, P10 y P8 se encontrarían en dos fracciones con una asociación diferencial en la espora.

3.1.5.b. Presencia de P18, P10 y P8 en esporas sumergidas.

Estas proteínas no se encontrarían presentes en las esporas sumergidas. En efecto, utilizando la técnica de Western, no se detectaron las proteínas al aplicar sobre las esporas sumergidas extracciones como las descritas anteriormente. Sin embargo, se detectó la acumulación de estas proteínas en el medio de cultivo (Figura 15A). Tal acumulación fue concomitante al aumento de la cantidad de esporas (Figura 15C). Estas proteínas no se detectaron en líquidos sobrenadantes de medios de cultivo en los cuales no se observa esporulación (no mostrado) ni tampoco en micelio aéreo vegetativo (no esporulante).

3.1.6. Clonamiento de genes de hidrofobinas expresados durante la esporulación.

3.1.6.a. Construcción de una genoteca de cDNA.

La genoteca fue construida con los cDNA sintetizados a partir de los RNAm presentes en el micelio después de 72 h de cultivo en el MLE (Figura 15). En tal momento se estarían expresando plenamente los genes que codifican las proteínas tipo hidrofobinas.

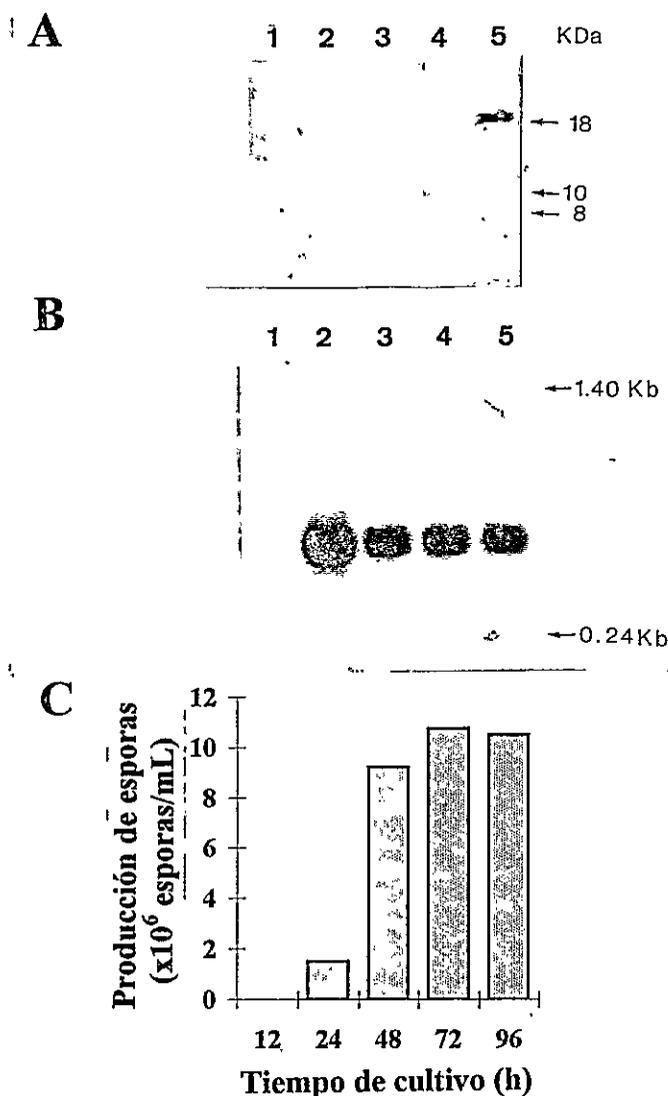


Figura 15. Caracterización de la esporulación de *T. harzianum* en medios líquidos. Se cultivó el hongo en MLE, tomando muestras a las 12, 24, 48, 72 y 96 h de cultivo (carriles 1 al 5 en A y B). En cada muestra se determinó la presencia de las proteínas P18, P10 y P8 (A), la expresión del gen homólogo a *hfb2* (B) y el nivel de esporas producidas (C). En A, las proteínas solubles del medio de cultivo fueron precipitadas con TCA y analizadas mediante la técnica de Western usando suero antiHFB1. En B, El RNA total extraído del micelio fue analizado mediante la técnica de Northern usando el gen clonado de *T. harzianum* homólogo a *hfb2* como sonda.

La fracción poliadenilada fue aislada del RNA total, los que fueron utilizados para sintetizar los cDNA como se detalló en Materiales y Métodos. Los cDNA sintetizados se ligaron en el vector de expresión, derivado del fago lambda, Uni-ZAP™ XR, los productos de la ligación se empacaron y la solución de fagos obtenida fue titulada como se describe en Materiales y Métodos. La genoteca sin amplificar arrojó un total 1.9×10^5 ufp (unidades formadoras de placas de lisis) totales con un 40% de recombinantes. Al realizar las titulaciones se encontró que el número de placas de lisis disminuía al inducir con IPTG, lo que hizo sospechar una posible toxicidad de los productos clonados para la célula huésped. La genoteca obtenida fue posteriormente amplificada (título final de 7.6×10^{10} ufp/mL) y almacenada hasta realizar la selección.

3.1.6.b. Selección y purificación de los clones.

En primera instancia se realizó una selección inmunológica utilizando el suero preparado contra HFB1, debido a la fuerte reacción que tales anticuerpos presentaron hacia P18 (Figura 12). A pesar de analizar más de 1×10^5 recombinantes, no se detectaron placas positivas.

Alternativamente, se intentó una selección basado en hibridización heteróloga usando como sonda el gen *hfb2* de *T. reesei*. Con este objetivo, se realizaron análisis mediante la técnica de Southern, encontrando condiciones de mediana estrictez (ver Materiales y Metodos) con las cuales se obtuvo un patrón parcial de

bandas que hibridizan con la sonda (Figura 16). De las enzimas de restricción utilizadas, solo Sal I reconoce un sitio en *hfb2*. En los experimentos anteriores siempre se observaron dos bandas con una fuerte señal de hibridización y un número variable de bandas con señales más débiles. Esto indicaría la existencia en *T. harzianum* de varios genes homólogos a *hfb2* de *T. reesei*.

Las condiciones anteriores de hibridización fueron aplicadas para la búsqueda de clones en la genoteca de cDNA. En la selección primaria, se analizaron 8000 recombinantes obteniendo más de cincuenta señales positivas. Esto indica que durante la esporulación se estarían expresando en un alto nivel genes homólogos a *hfb2*. Se aislaron 12 fagos que presentaban señales de diversas intensidades en la selección primaria (S, M y L según si la señal hubiera sido fuerte, mediana o débil, respectivamente). Estos se sometieron, nuevamente, al mismo tipo de selección lo que permitió purificarlos. En la selección secundaria no se encontraron diferencias en las señales de hibridización de las placas de lisis. Las diferencias encontradas en la selección primaria se pudieron deber a la cercanía y heterogéneo tamaño de las placas de lisis.

Los 12 clones obtenidos fueron subclonados mediante excisión *in vivo* y obteniendo el fragmento clonado bajo la forma plasmidial en el fagemido pBluescrip SK(-) (ver Materiales y Métodos). Se extrajo el DNA plasmidial de los clones seleccionados, los que se sometieron a una doble digestión con Xho I y EcoR I para

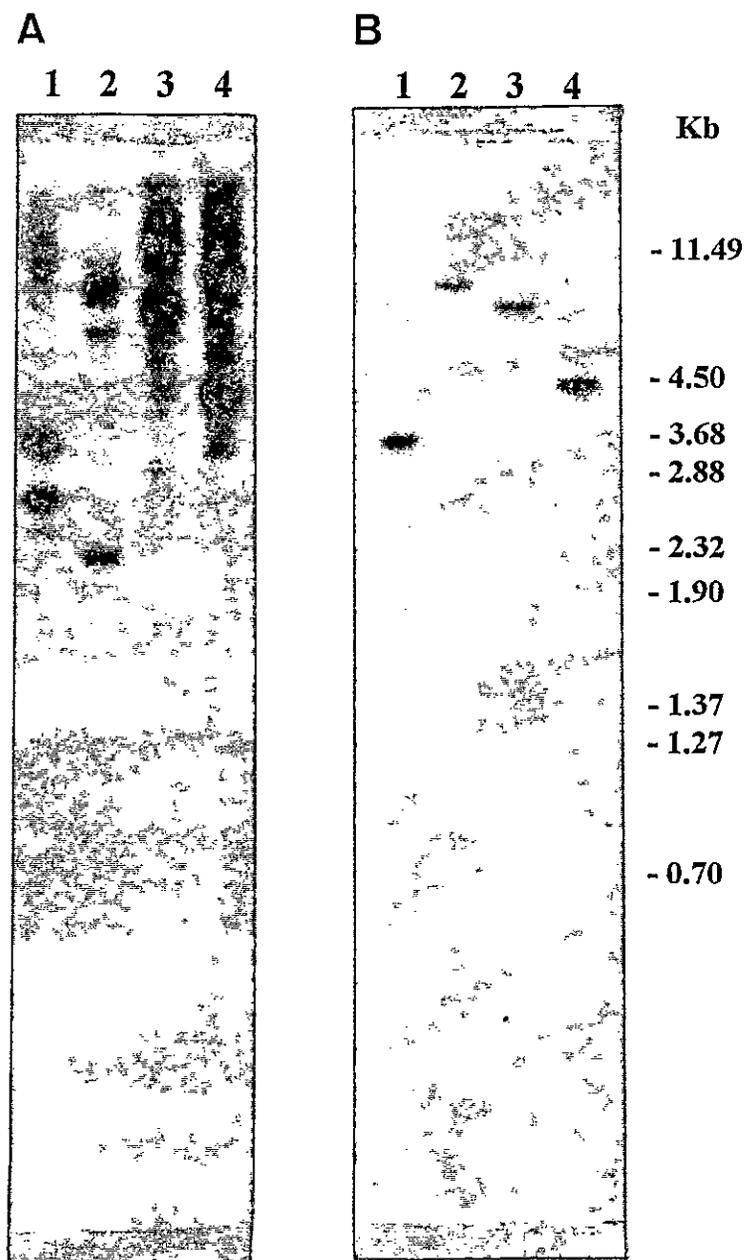


Figura 16. Determinación de genes en *T. harzianum* homólogos a *hfb2*. El DNA genómico del hongo fue analizado mediante la técnica de Southern utilizando *hfb2* (A) y el fragmento clonado p3cL2a (B) marcados con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ a la misma actividad específica como sondas. Las condiciones de hibridización fueron de mediana (A) y alta (B) estrictez. El DNA fue digerido con las enzimas de restricción Sal I, Pst I, Xho I EcoR I (carriles 1 al 4). A la derecha se indica la migración de marcadores de tamaño molecular en kb.

liberar el inserto. Al analizar los productos de la digestión en geles de agarosa, se encontró que todos contenían un fragmento de alrededor de 0.6 Kb que presentó leves variaciones en su movilidad electroforética (Figura 17). Se seleccionaron aquellos que contenían un inserto de mayor tamaño. Uno de ellos denominado p3cL2a se encuentra actualmente en secuenciación.

3.1.7. Regulación de la expresión del gen de *T. harzianum* homólogo a *hfb2*.

3.1.7.a. Expresión bajo condiciones de esporulación.

Utilizando el fragmento clonado p3cL2a como sonda, se analizó la expresión de este gen durante la esporulación en medio líquido. Como se muestra en la Figura 15, el putativo gen homólogo a *hfb2* se expresa en *T. harzianum* fuertemente a partir de las 24 h de cultivo, momento en que la esporulación se encuentra en una fase exponencial. La banda de hibridización se encuentra en la zona correspondientes a un tamaño cercano a los 0.6 Kb. Posteriormente, las intensidades de las señales tienden a una leve disminución. Mayóres tiempo de exposición de las membranas mostraron que la banda presenta una baja señal a las 12 h de cultivo. Esto indica que el putativo gen se sobreexpresaría durante la esporulación en medio líquido.

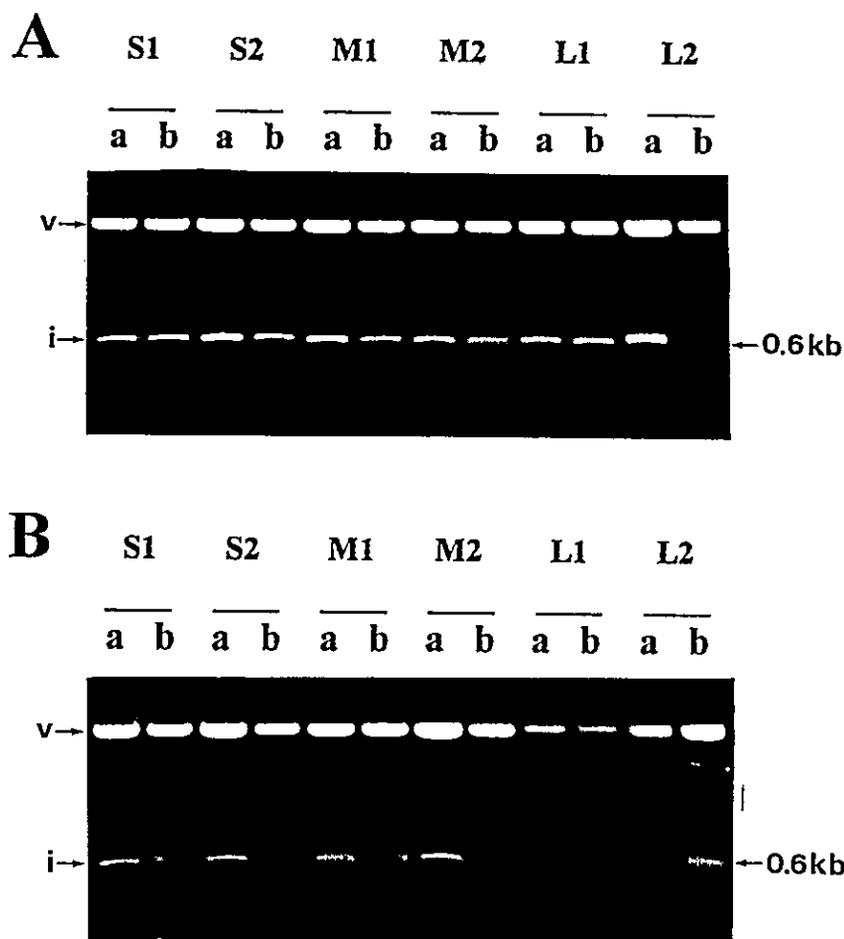


Figura 17. Análisis del tamaño de inserto de los clones seleccionados homólogo a *hfb2*. Se estrajo el DNA plasmidial de los 12 clones seleccionados de la genoteca de cDNA, previamente transformados a la forma plasmidial. Después de una doble digestión con Xho I y EcoR I, los productos se fraccionaron electroforéticamente en geles de agarosa al 0.8% con TBE, posteriormente teñidos con bromuro de etidio y fotografiados en un transiluminador UV. En A se muestra los grupos de clones denominados 3c y en B aquellos 1c. Para cada clon (S1, S2, M1, M2, L1 y L2) se analizaron dos colonias (a y b) obtenidas después de la excisión *in vivo*. V e I, indican el vector y el inserto respectivamente. A la derecha de la figura, se indica la migración del marcador de tamaño molecular correspondiente a 0.6 kilobases.

Similar resultado se encontró al analizar los RNA presentes durante el crecimiento aéreo de *T. harzianum*. En efecto, una banda de 0.6 Kb con una baja señal de hibridización se detectó en el micelio aéreo no esporulante (Figura 18, carril 1). Al inducir la esporulación en el micelio, la banda incrementa notablemente su señal de hibridización (Figura 18, carril 2). Esto estaría indicando que bajo las condiciones de crecimiento aéreo, el gen clonado se expresaría a bajos niveles en tejido vegetativo, sobreexpresándose durante la esporulación.

3.1.7.b. Efecto de la limitación de nutrientes sobre la expresión del gen homólogo a *hfb2*.

Se pre-cultivó el hongo en MLE suplementado con 0.2% de peptona para obtener una mayor biomasa. Después de 20 h de cultivo, el micelio se traspasó, mediante centrifugación, a las nuevas condiciones de cultivo. Posteriormente, se tomaron muestras cada 4 h por un período de 12 h, de las cuales se extrajo el RNA total. A las 24 de incubación, se analizó, además, la pigmentación, presencia de esporas y de proteínas tipo hidrofobinas en el líquido de cultivo.

Los resultados de tal experimento mostraron que al momento de iniciar la incubación en los nuevos medios, el putativo gen homólogo a *hfb2* no se estaba expresando (Figura 19A I-IV, carril 1). Aun exponiendo más tiempo las membranas, no se encontró una señal de hibridización. La ausencia de una fuente de carbono y/o



Figura 18. Expresión del gen homólogo a *hfb2* durante el crecimiento aéreo de *T. harzianum* bajo condiciones vegetativas y de esporulación. Se analizó el RNA extraído del micelio aéreo crecido bajo condiciones vegetativas (1) o de esporulación (2) mediante la técnica de Northern usando el fragmento p3cL2a como sonda. El micelio vegetativo se obtuvo cultivando el hongo en placas de Petri con AML. El micelio así obtenido se traspasó a placas con AMLI, induciendo la esporulación.

nitrógeno, en cambio, indujo una fuerte expresión del gen (Figura 19A II-IV). Esto coincidió con la detección de proteínas tipo hidrofobinas bajo tales condiciones. La expresión del gen, sin embargo, no correlacionó con el desarrollo de una elevada esporulación. En efecto, se encontraron altos niveles de esporas ante la ausencia de glucosa o de glucosa y amonio (Figura 19B), los que además, presentaban la típica pigmentación verde de cultivos bajo esporulación.

Por otro lado, se encontró una baja y transiente expresión del gen durante el cultivo del hongo en el medio con todos los nutrientes presentes (Figura 19AI). Este fue mayor a las 4 h, siendo casi imperceptible a tiempo posteriores. En estas condiciones el hongo no esporuló ni evidenció proteínas tipo hidrofobinas.

En los experimentos de las Figuras 18 y 19 no se detectaron otras bandas de hibridización, aún cuando inicialmente se utilizaron condiciones de baja estrictez en las hibridizaciones RNA-DNA. Esto indica que bajo condiciones de esporulación, en *T. harziazum* se expresaría un solo gen homólogo a *hfb2*.

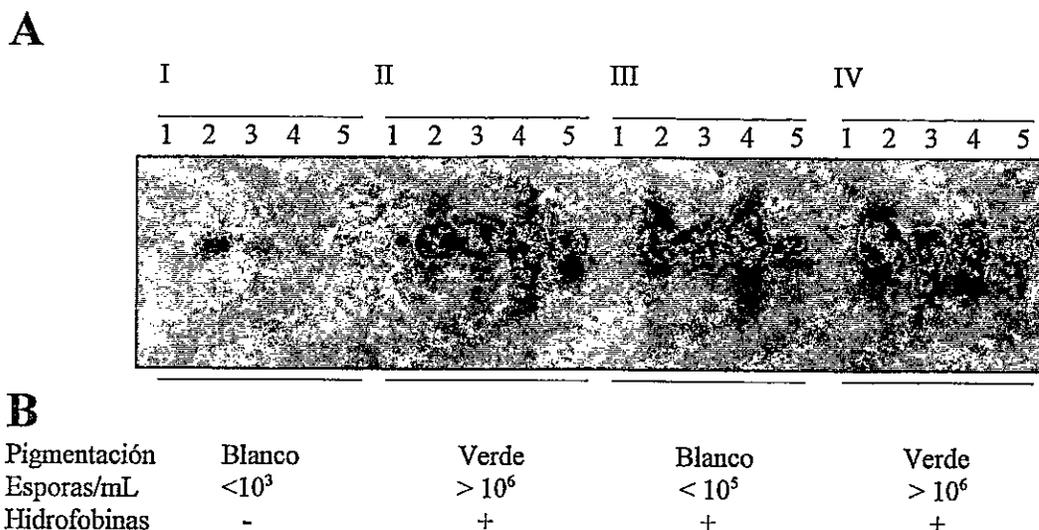


Figura 19. Efecto de limitación de nutrientes sobre la expresión en *T. harzianum* del gen homólogo a *hfb2*. El hongo se precultivó en MLE suplementado con 0.2% de peptona y luego traspasado a un medio salino basal suplementado con 2% glucosa y 1% amonio (A, I), 2% glucosa (A, II), 1% amonio (A, III) o sin suplementación (A, IV). Se tomaron muestras de micelio al inicio de los nuevos cultivos, 4, 8, 12 y 24 h después de incubarlos bajo condiciones normales (carriles 1 al 5). A las 24 h se analizó, además, la presencia de esporas, hidrofobinas y pigmentación de los cultivos (B). La presencia de hidrofobinas se realizó en el líquido de cultivo mediante SDS-PAGE con 18% poliacrilamida seguido de tinción de Coomassie.

3.2. Caracterización de las condiciones que activan la germinación de las esporas aéreas de *T. harzianum*.

3.2.1. Requerimientos para la germinación de las esporas aéreas.

La determinación de las condiciones óptimas para la germinación se realizó utilizando MG. La germinación se evaluó morfológicamente como la aparición del tubo germinativo.

3.2.1.a. Factores abióticos.

La concentración de esporas no tuvo un efecto marcado sobre la germinación. La concentración óptima se observó dentro del orden de 10^6 sps/mL (Tabla 4). Niveles más altos presentaron leves reducciones en las tasas de germinación (alrededor de un 20% con 10^8 esporas/mL).

La germinación se desarrolló rápidamente a pH ácidos, reduciéndose la velocidad de germinación al aproximarse al rango alcalino. Como lo muestra la Tabla 4, el valor óptimo fue pH 4.0.

El rango de temperatura óptima se encontró entre los 25 y 30°C (Tabla 4). Temperaturas mayores a 30°C tienen un efecto más marcado en reducir la velocidad de germinación que aquellas inferiores a 22°C. En estos experimentos, siempre se alcanzó el máximo de germinación, indicando que las temperaturas probadas si bien afectan la germinación, son capaces de sostenerla.

Tabla 4
Valores óptimos encontrados para varios parámetros que
inciden en la germinación de esporas aéreas
de *T. harzianum* (1).

Parámetro	Rango ensayado	Valor óptimo
Concentración de esporas ⁽²⁾ (esporas/mL)	10 ⁵ - 10 ⁸	2x10 ⁶
Temperatura ⁽³⁾ (°C)	4 - 35	28
pH ⁽³⁾	4.0 - 7.0	4.0
Actividad de agua ⁽³⁾	0.94 - 1.0	0.98

(1) Para detalles experimentales ver Materiales y Métodos.

(2) Se analizó el máximo de germinación alcanzado después de 12 h incubación en MG.

(3) Se analizó la velocidad máxima de germinación, el tiempo sobre el cual germinan más del 5 % de las esporas y el máximo porcentaje de germinación observado.

El rango óptimo para la actividad de agua se encontraría sobre 0.98 (Tabla 4). Entre 0.98 y 0.950 la tasa de germinación se reduce drásticamente, alcanzando valores prácticamente nulos a actividades de agua inferiores a 0.945. Dentro de los tiempos involucrados en estos experimentos, el porcentaje máximo de germinación fue menor al 50% a valores de actividad de agua inferiores a 0.950. Esto indica la imposibilidad del hongo para germinar bajo tales condiciones, requiriendo por lo tanto altas humedades.

La velocidad de germinación no se vió afectada al hacer germinar esporas en un medio donde, previamente, habían germinado similar concentración de esporas (no mostrado). Estos experimentos se realizaron bajo concentraciones óptimas de esporas, por lo que se puede decir que bajo tales condiciones no estarían actuando compuestos autoinhibidores o autoactivadores.

3.2.1.b. Efecto de nutrientes.

Las esporas no desarrollaron el tubo germinativo al ser incubadas solamente en agua o sales de M \bar{G} . Tampoco germinaron al ser incubadas ya sea con glucosa o con amonio, como único nutriente. Lo contrario ocurrió cuando el único nutriente fue peptona. Esto indica un requerimiento tanto de fuentes de carbono como de nitrógeno para la germinación.

El nitrógeno orgánico suplementado a través de la peptona suficiente para sustentar altas tasas de germinación. La adición de glucosa, extracto de levadura y una solución completa de vitaminas, a la condición anterior no evidenció un incremento en la tasa de germinativa (no mostrado). Entre los aminoácidos componentes de la peptona, ninguno presentó un efecto particularmente elevado en cuanto a sustentar una alta germinación, aún en presencia de glucosa (Tabla 5). Por lo tanto, no existiría algún aminoácido que pudiera actuar como un germinante específico. El efecto de cada aminoácido no se relacionó con alguna de sus propiedades químicas ellos, como el carácter ácido o básico por ejemplo.

Se encontró, además, que las esporas pueden germinar sobre fuentes de nitrógeno inorgánicas al ser estas incluidas en MG (Tabla 5). La significativa germinación en amonio permitió definir una condición nutricional mínima (medio mínimo de germinación, MMG), donde estudiar el metabolismo involucrado en este proceso.

Hay que hacer notar que aún bajo las condiciones óptimas, la aparición del tubo germinativo -evento final de la germinación- se observa desde las 8 h en adelante alcanzando el máximo a las 12h. En el medio mínimo este proceso fue más lento (ver más adelante las Figuras 21A y 22).

Tabla 5
Efecto de fuentes de nitrógeno sobre la germinación
de esporas aéreas de *T. harzianum*.

Fuentes de Nitrógeno	Porcentaje de germinación
Orgánicas	
Peptona	95 ± 3
Arginina	89 ± 6
Ac. Aspártico	11 ± 3
Ac. Glutámico	74 ± 3
Serina	74 ± 4
Alanina	87 ± 5
Glutamina	65 ± 2
Urea	67 ± 4
Inorgánicas	
NH ₄ (SO ₄) ₂	63 ± 5
NaNO ₃	20 ± 3

(1) Las esporas fueron incubadas 12 h en MG, medio al que se le sustituyó la fuente de nitrógeno por 20 mM del compuesto indicado. La germinación se evaluó como el porcentaje de esporas con tubo germinativo al final de la incubación.

3.2.2. Cambios morfológicos durante la germinación.

Una vez determinadas las condiciones bajo las cuales ocurre la germinación, se procedió a analizar la secuencia de eventos morfológicos implicados, determinando cuales son específicos de la germinación. Estas alteraciones, se intentaron correlacionar con cambios en la permeabilidad y actividad respiratoria de las esporas. Para estos análisis, las esporas se incubaron en el medio MG con peptona como fuente de nitrógeno, debido a que bajo tales condiciones la germinación es rápida y sincrónica.

Una de los primeros cambios se observó sobre el grosor de la pared (Figuras 20A, B). En efecto, el grosor de la pared externa de la spora (capa W₂) disminuye a la mitad durante la primera hora de germinación. Durante las primeras dos horas de germinación ocurre, además, una desaparición de los cuerpos electrodensos y aparición de vesículas periféricas, electrotransparentes. Estas últimas, parecen fusionarse con la membrana citoplasmática, que se aprecia particularmente retraída (Figura 20A, B y C). Tales observaciones indican un desarrollo temprano de actividad metabólica, aunque durante este periodo de tiempo se detecta una baja pero significativa respiración (menor que 0.5 μ L de oxígeno/min/ 10^8 esporas, Figura 21A). Se observó, además, vacuolas con material electrodenso, cuyo aspecto granuloso sugiere degradación (Figura 20 B). Vacuolas de este tipo no serían específicas del estado germinativo, pues estuvieron presentes durante todo el proceso de

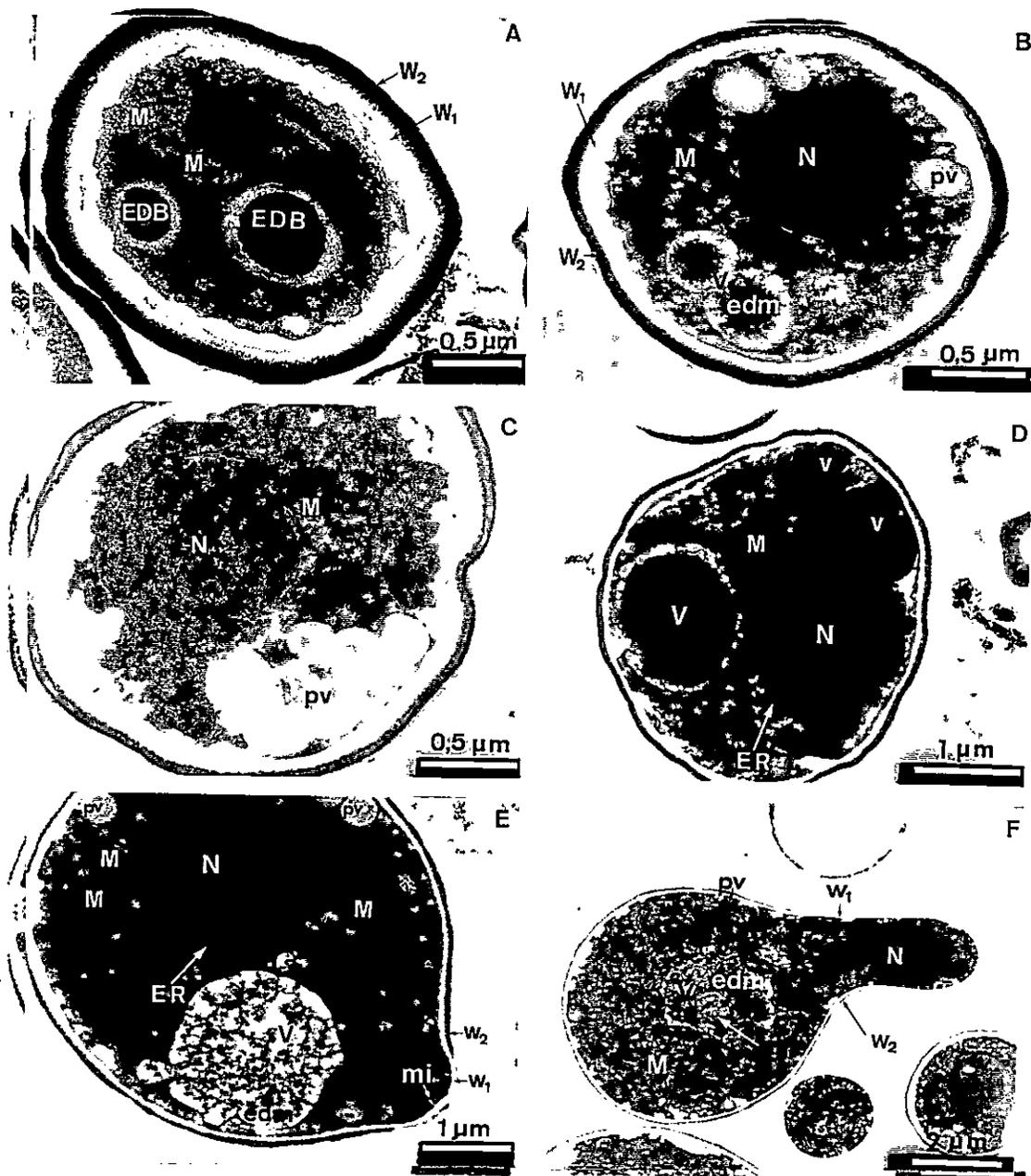


Figura 20. Cambios ultraestructurales durante la germinación de esporas de *T. harzianum*. Las esporas aéreas del hongo se incubaron en MG. A distintos tiempos se tomaron muestras para análisis mediante microscopía de transmisión. A, esporas sin germinar; B a F, 1, 2, 6, 8 y 10 h de germinación, respectivamente.

Simbología: EDB, cuerpos electrodensos; M, mitocondrias; W_1 y W_2 , pared interna y externa de la spora; N, núcleo; V, vacuola; pv, vesícula periférica; edm, material electrodenso; ER, retículo endoplásmico; mi, invaginación de membrana; mf, figuras de membranas.

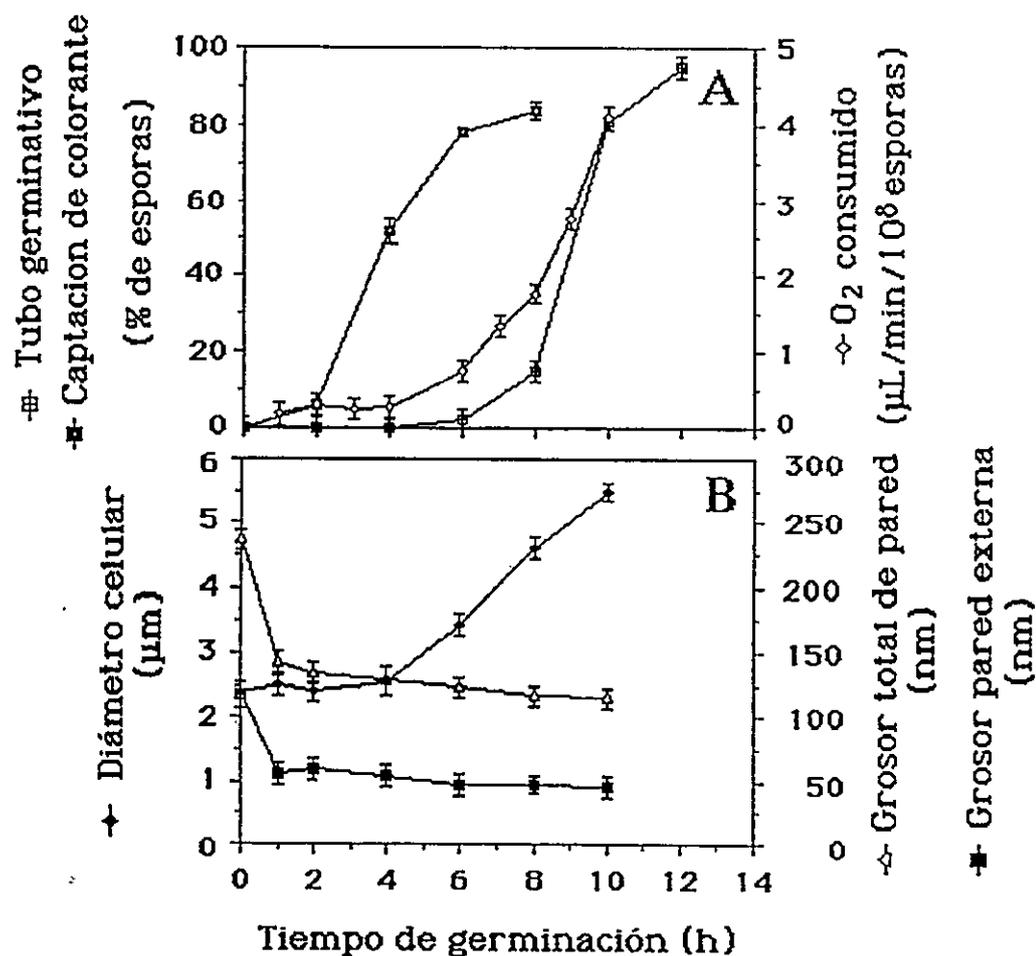


Figura 21. Cambios morfológicos y metabólicos durante la germinación de esporas de *T. harzianum* bajo condiciones óptimas. Las esporas del hongo se hicieron germinar en MG. Se evaluó en el tiempo la aparición del tubo germinativo y la captación del colorante azul de lactofenol. Como indicador metabólico se evaluó la tasa de consumo de oxígeno (A). Paralelamente, las muestras se procesaron para análisis mediante microscopía de transmisión y evaluar el tamaño de la esporas y grosor de las paredes (B). Estos últimos datos provienen de la Figura 20.

germinación, incluso en esporas con el tubo germinativo desarrollado (Figura 20 E y F).

A partir de la cuarta hora en adelante, el tamaño de la espora comenzó a aumentar de tamaño (Figura 21B). Esto coincidió con una mayor permeabilidad de la espora, pues en tales momentos fue capaz de captar colorantes como el azul de lactofenol (Figura 21A). Esto indicaría alteraciones al nivel de la pared. Se observó también, un aumento en el número de mitocondrias (Figura 20 C y D). Sin embargo, solo posteriormente se detectó un consumo de oxígeno en forma significativamente elevada (Figura 22A).

Las esporas de *T. harzianum* P1 -mononucleadas- sufren división nuclear durante los últimos estadios de la germinación, es decir, luego de 8h de incubación.

En la zona de aparición del tubo germinativo (Figura 20E), se observó una específica y polarizada degradación de la pared externa. Esta capa no se observa en la hifa (Figura 20F), indicando una diferenciación específica de la capa W₂ en la espora.

3.2.3. Activación metabólica durante la germinación.

Para elucidar la secuencia del establecimiento de los eventos fisiológicos involucrados en la germinación, y la dependencia de éstos con respecto a la presencia de nutrientes exógenos, las esporas se hicieron germinar en el medio mínimo de germinación (MMG).

3.2.3.a. Actividad respiratoria.

El consumo de oxígeno comenzó a incrementarse exponencialmente a partir de las 7 horas de germinación en MMG (Figura 22), precediendo a la aparición del tubo germinativo. Durante las primeras 5h de germinación, se observó, una reducida pero sostenida y significativa consumo de oxígeno (menos de 0.3 μL de O_2 consumidos/min/ 10^8 esporas). Tal consumo fue totalmente inhibido por cianuro (1 mM), indicando una real actividad respiratoria. Esta actividad no se expresaría a niveles significativos como para que permita analizar el efecto de los nutrientes exógenos sobre su activación.

3.2.3.b. Síntesis de proteínas.

Las esporas incorporaron [^{14}C]leucina desde los primeros momentos de germinación en MMG. La incorporación se incrementó exponencialmente a partir de las 4 h de germinación, precediendo a la actividad respiratoria (Figura 22). La incorporación del aminoácido fue inhibida por cicloheximida tanto al comienzo como a tiempos posteriores de la germinación (Figura 23). Cabe notar que la inhibición sobre la incorporación temprana fue menor que aquella

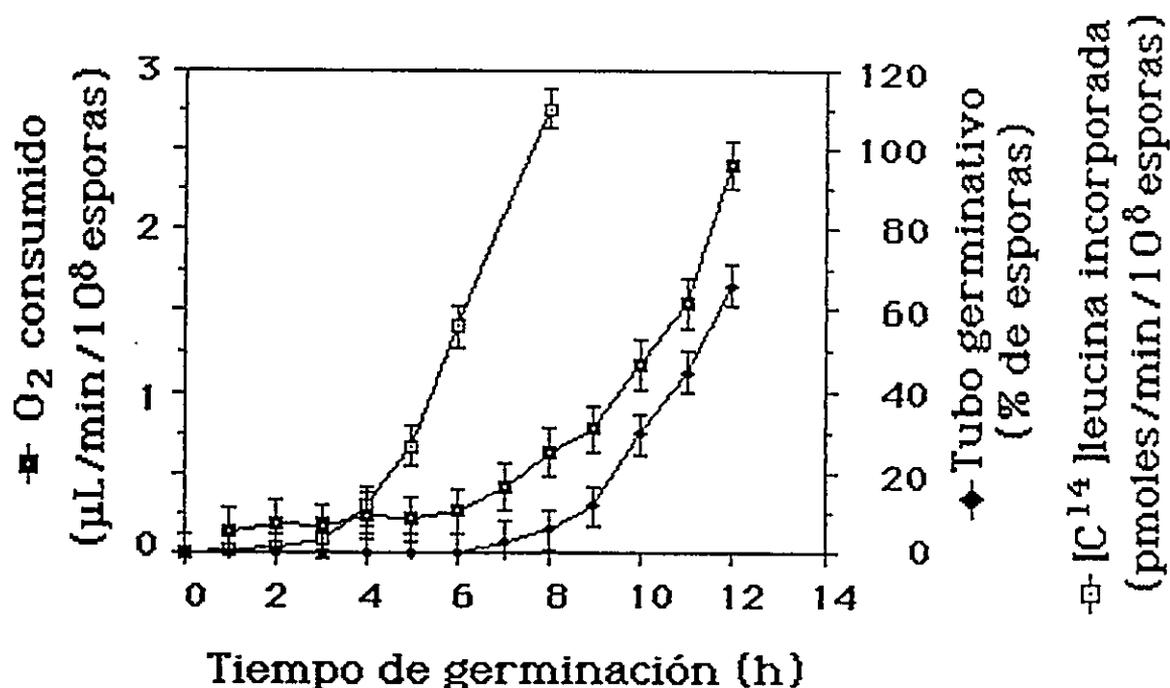


Figura 22. Evolución de la germinación de las esporas de *T. harzianum* en MMG. Las esporas se hicieron germinar en MMG. Se evaluó en el tiempo la aparición de tubo germinativo como indicador de germinación morfológica, la tasa de consumo de oxígeno como indicador global de actividad metabólica, y en forma particular, la síntesis de proteína mediante la incorporación de [C¹⁴]leucina en las esporas.

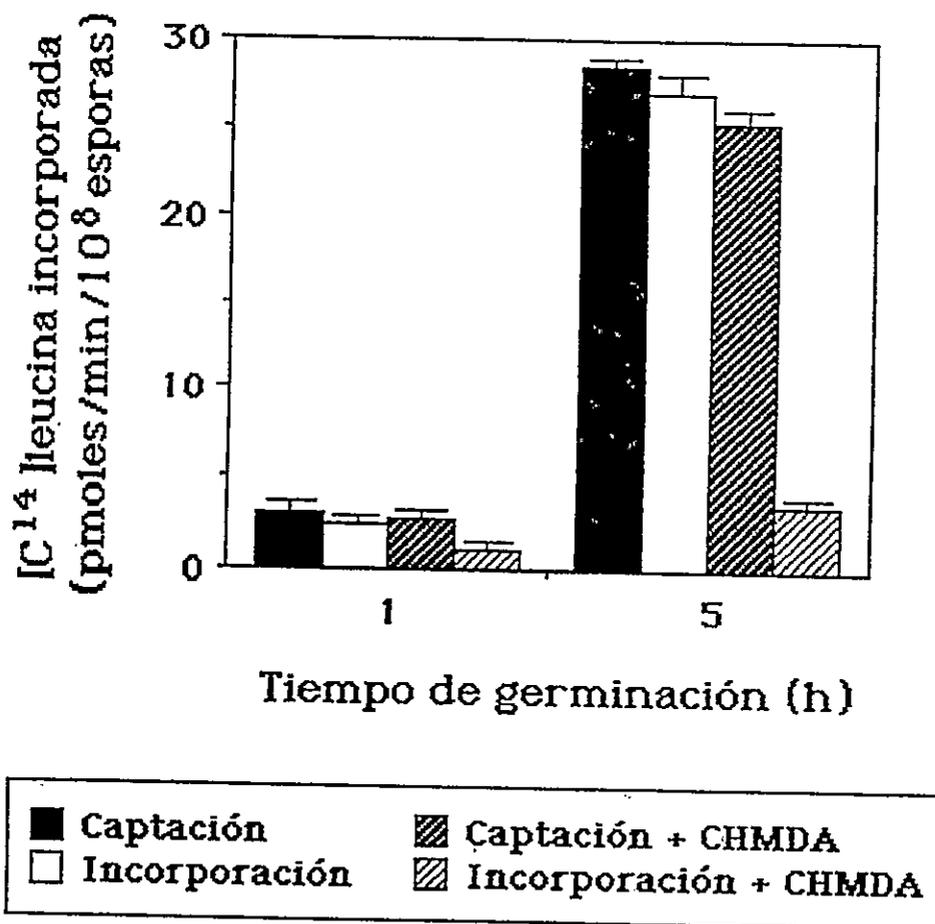


Figura 23. Efecto de cicloheximida sobre la incorporación y captación de $[C^{14}]$ leucina durante la germinación de esporas de *T. harzianum*. Las esporas se hicieron germinar en MMG, tomando alícuotas a determinados tiempos que fueron sometidas a un pulso con el precursor marcado. Se determinó la radioactividad total asociada a la espora (captación) y la presente en la fracción precipitable con TCA (incorporación). Ambas actividades fueron determinadas tanto en ausencia como presencia de $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cicloheximida (CHMDA).

a tiempos tardíos (50% vs 87%, Figura 23), lo que se podría deber a problemas de permeabilidad del inhibidor.

Se utilizó la síntesis de proteínas como marcador de actividad metabólica para evaluar el efecto de los nutrientes sobre su activación (Figura 24). En ausencia de la fuente de carbono o nitrógeno del medio de germinación, no se observó la incorporación exponencial presentada en el medio completo. Sin embargo, se detectó una baja pero significativa y sostenida incorporación de $[C^{14}]$ leucina. Esta fue inhibida por cicloheximida (no mostrado). Esto sugiere que condiciones que no permiten la germinación morfológica, pueden desarrollar algún tipo de actividad metabólica. Debido a que la incorporación no fue detectada al incubar las esporas en agua, este efecto sería inducido por los nutrientes.

3.2.4. Metabolismo del nitrógeno durante la germinación.

3.2.4.a. Niveles de aminoácidos endógenos libres en esporas de *T. harzianum*.

Como se aprecia en la Tabla 6, los niveles de tales compuestos alcanza casi un 0.8% del peso seco de las esporas sin germinar. Al estar totalmente germinada (15 h de germinación), éstos se incrementan en un 50%.

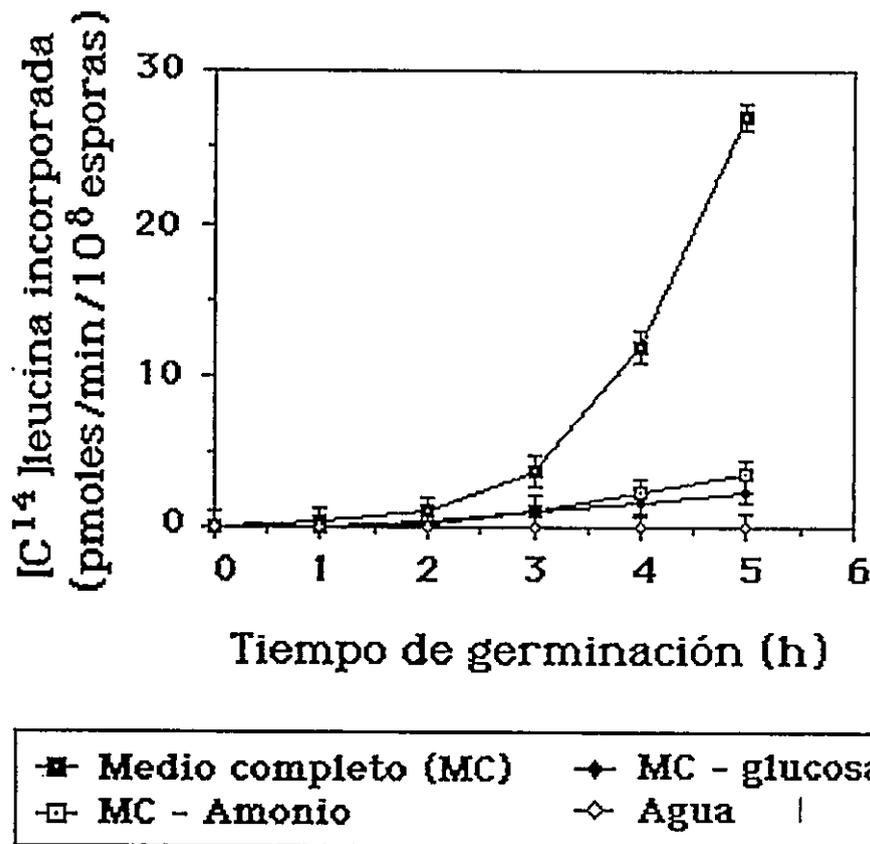


Figura 24. Efecto de los nutrientes sobre la incorporación de $[C^{14}]$ leucina en esporas de *T. harzianum*. Las esporas del hongo se incubaron en MMG en presencia de todos sus nutrientes (MC) o bien en ausencia de alguno de ellos, como se indica en la figura. A los tiempos indicados, alicuotas de los cultivos se sometieron a un pulso de 15 min con el compuesto marcado.

Tabla 6
 Contenido de aminoácidos endógenos libres en esporas de
T. harzianum con diferente estado germinativo

Aminoácido	Contenido ($\mu\text{g/g}$ seco de esporas)	
	sin germinar ⁽¹⁾	germinadas ⁽²⁾
Ac. Aspártico	36	16
Ac. Glutámico	388	423
Asparragina	15	27
Serina	53	31
Glutamina	123	201
Glicina	16	12
Histidina	1	30
Arginina	43	20
Treonina	8	21
Alanina	42	231
Prolina	17	18
Tirosina	3	22
Valina	12	23
Metionina	16	12
Cisteína	1	1
Isoleucina	5	5
Leucina	10	40
Fenilalanina	4	5
Lisina	5	14
TOTAL	798	1152

(1) Esporas colectadas directamente de placas de AMLI.

(2) Esporas colectadas después de 15 h de incubación en MMG.

En las esporas sin germinar, glutamato y glutamina representan casi la mitad del total de aminoácidos libres, siguiéndoles en importancia serina, alanina, arginina y aspartato que alcanzan casi un 20% (Tabla 6). En las esporas germinadas, en cambio, glutamina, glutamato y alanina representan alrededor del 80% del total de los aminoácidos libres.

3.2.4.b. Evolución de los niveles de glutamina y glutamato durante la germinación.

Como se aprecia en la Figura 25A, durante las primeras 2 horas de germinación ocurre un cambio dramático en los niveles de los principales aminoácidos de las esporas sin germinar. En efecto, el nivel de glutamina disminuye concomitantemente a un aumento en el contenido de glutamato. Este último se mantiene constante durante el resto de la germinación, mientras que glutamina se incrementa hasta casi los niveles iniciales.

Los cambios en el contenido de glutamina y glutamato son equivalentes en términos molares (alrededor de 17 μ moles/g espora). Esto sugiere una transformación de ambos compuestos, implicando la presencia de actividad glutamina sintetasa.

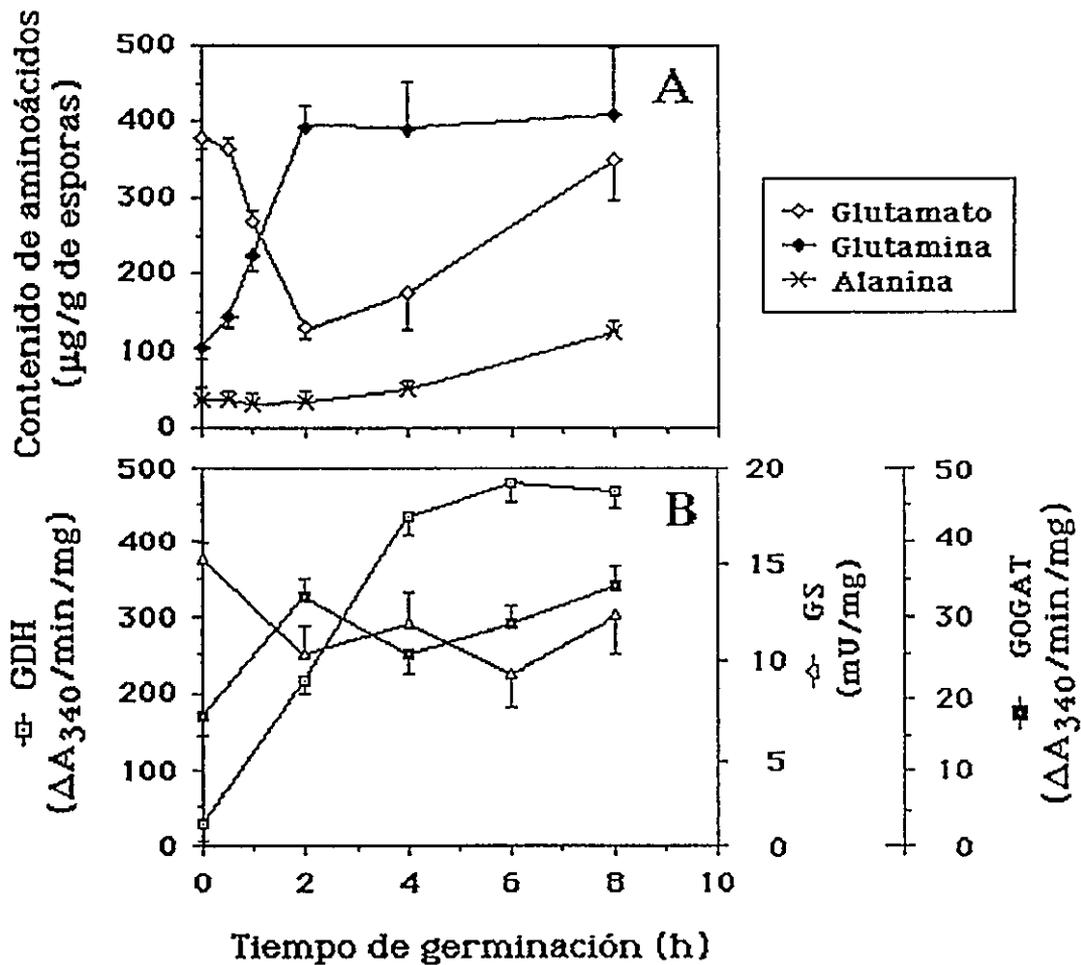


Figura 25. Metabolismo de compuestos nitrogenados durante la germinación de esporas de *T. harzianum*. Las esporas se hicieron germinar en MMG, tomándose muestras a los tiempos indicados, las cuales fueron procesadas para determinar los niveles de aminoácidos (A) y se prepararon extractos libres de células para la determinación de las actividades enzimáticas (B).

3.2.4.c. Enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno durante la germinación.

El análisis de la actividad de las enzimas glutamina sintetasa (GS) glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamato sintasa (GOGAT) durante la germinación mostró que GS se encontraría preservada en las esporas sin germinar. En efecto, se detectó una significativa actividad de GS en las esporas sin germinar, la que se conservó a niveles constantes durante el resto de la germinación (Figura 25B). Similar nivel de actividad se encontró presente en muestras de micelio en activo crecimiento (Tabla 7).

GDH y GOGAT, en cambio, se encontraron a reducidos niveles en la esporas sin germinar (Figura 25B). Después de dos horas, ambas actividades se incrementaron. La mezcla de extractos provenientes de esporas sin germinar con los de aquellas esporas germinadas no evidenció una inhibición significativa de las actividades. Por lo tanto, la baja actividad inicial no involucraría la presencia de inhibidores.

GDH presentó un notable incremento durante la germinación (Figura 25B). De hecho, su actividad aumentó en forma exponencial hasta las 8 horas de germinación. Tales niveles fueron cercanos a la mitad de la actividad detectada en micelio creciendo activamente (Tabla 7).

Tabla 7
 Actividad específica de las enzimas involucradas en la asimilación
 del nitrógeno durante la germinación y crecimiento
 de *T. harzianum*.

Condición de cultivo	Actividad específica		
	GS (mU/mg)	GDH ($\Delta A/\text{min}/\text{mg}$, 10^3)	GOGAT ($\Delta A/\text{min}/\text{mg}$, 10^3)
Esporas			
sin germinar ⁽¹⁾	16 \pm 4	11 \pm 3	17 \pm 3
germinadas ⁽²⁾	12 \pm 5	427 \pm 6	34 \pm 2
Micelio			
Fase exponencial ⁽³⁾	19 \pm 4	789 \pm 5	32 \pm 3
Fase Estacionaria ⁽⁴⁾	111 \pm 6	1360 \pm 8	138 \pm 4

(1) Esporas colectadas directamente desde placas con AMLI.

(2) Esporas incubadas 8 h en el medio MMG.

(3) Micelio obtenido después de incubar esporas 24 h en el medio
 MMG suplementado con glucosa al 4%

(4) Micelio obtenido al igual que en (3) pero después de 96 h de
 cultivo

GOGAT, en cambio, duplicó su actividad a las dos horas de germinación, manteniéndose a tales niveles durante el resto del proceso (Figura 25B). Los niveles alcanzados fueron similares a los obtenidos en micelio cultivado hasta la fase de crecimiento exponencial (Tabla 7).

Las tres enzimas analizadas incrementaron notablemente su actividad en muestras de micelio colectado durante la fase de crecimiento estacionaria. Esto último, se alcanza en el medio de cultivo utilizado por consumo de la fuente de nitrógeno, indicando que las actividades estarían sujetas a regulación por nitrógeno (Tabla 7).

3.2.4.d. Efecto de las condiciones de germinación sobre la actividad fisiológica de glutamina sintetasa.

Por lo anterior, se determinó si la actividad de glutamina sintetasa respondía, *in vivo*, a la presencia de nutrientes exógenos. Las esporas fueron incubadas durante dos horas en el medio mínimo de germinación, al cual se le omitió alguno de los nutrientes principales. Como se muestra en la Figura 26, la transformación glutamina/glutamato ocurrió aún en ausencia de nutrientes (esporas incubadas en agua). Esto sugiere que tal actividad no respondería a una activación específica por los nutrientes, requiriendo solo la presencia de agua.

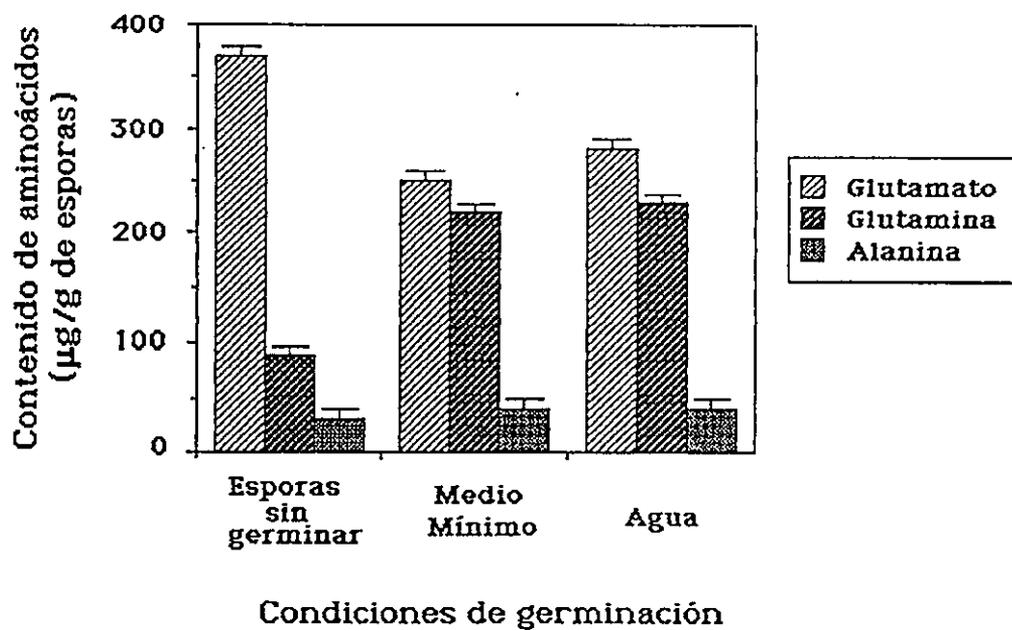


Figura 26. Efecto de los condiciones nutricionales sobre la actividad *in vivo* de glutamina sintetasa durante la germinación de esporas de *T. harzianum*. Las esporas se incubaron en MMG o bien en agua. Después de dos horas de incubación las esporas fueron analizadas en cuanto a su contenido de aminoácidos.

4. DISCUSION

Para el agente de biocontrol *T. harzianum*, se han estudiado en profundidad las condiciones de producción y los mecanismos involucrados en su actividad antagónica (Lewis y Papavizas, 1991; Goldman y cols., 1994). Actualmente, existen antecedentes que hacen suponer que las esporas producidas por tejido aéreo poseerían mejores características como biopesticidas. Las características de las esporas así producidas, que pudieran ser relevantes para el biocontrol, no han sido estudiadas. Por lo anterior, en esta tesis se estudiaron los factores relacionados con la adhesión y la modalidad para desencadenar la germinación de las esporas aéreas de *T. harzianum*, procesos claves para el eficiente accionar de biopesticidas bajo condiciones de campo.

Los primeros estudios realizados tuvieron como objetivo verificar si las esporas aéreas poseían características que favorecieran su utilización como agente de biocontrol.

El primer lugar se analizaron los cambios que sufría la spora durante su desarrollo ontogénico en tejidos aéreos, de modo de determinar las estructuras propias más importantes. Bajo las condiciones en que se indujo la esporulación aérea en la cepa P1, se obtuvo una población homogénea de esporas. El desarrollo ontogénico observado sugiere que las esporas "madurarían" sobre

la fiálide hasta su estado final. En este proceso se apreciaron importantes alteraciones a nivel del grosor de la pared y pigmentación. Esto último es similar a lo descrito en *Aspergillus nidulans*, donde el color verde de las esporas maduras está mediado por la actividad de una sintetasa específica de la spora (Mayorga y Timberlake, 1992).

La característica ultraestructural y citológica más notable de las esporas aéreas a nivel intracelular lo constituyó la escasa presencia de organelos celulares. Tales esporas, inicialmente son refractarias a captar colorantes y se establecen un metabolismo activo sólo después de 5 h de activada la germinación. Todo lo anterior indica que las esporas aéreas se encontrarían en un estado de latencia.

La viabilidad de las esporas aéreas fue menos afectada frente a radiaciones UV y bajo condiciones de almacenamiento que las esporas obtenidas en cultivo sumergido. Esto permite aseverar que las esporas aéreas serían más longevas que las producidas en medios líquidos.

La mayor resistencia a la radiación UV podría relacionarse con la presencia de pigmentos en la pared de la spora y al grosor de la misma. Si bien tanto las esporas sumergidas como las aéreas son pigmentadas, estas últimas por poseer una pared de mayor grosor y posiblemente un mayor contenido de pigmento,

presentarían una barrera más significativa contra la radiación. Aunque la presencia de pigmentos no se analizó directamente, se podría especular acerca de la presencia de poder reductor en la superficie de la espora, como un mecanismo de defensa contra agentes fotosensibilizadores (Cooperman-Sollod y cols., 1992). No se sabe si las esporas fúngicas poseen algún sistema especial de protección del DNA específico para su estado de latencia, como el descrito en endosporas bacterianas (Setlow, 1988).

Por otro lado, la mantención de la viabilidad de las esporas bajo condiciones de almacenamiento ha sido atribuida a varios factores. Entre éstos, se encuentra el estado anhidrobiótico de las esporas (Fahey y cols., 1978, Crowe y Crowe, 1992), compuestos endógenos como la trehalosa (Jin y cols., 1992) y la presencia de ciertos componentes de la matriz extracelular (Nicholson y Moraes, 1980).

La trehalosa se encuentra comunmente en esporas fúngicas, así como en microorganismos resistentes a deshidratación (Crowe y Crowe, 1992). Ha sido relacionada con la termotolerancia, así como con la estabilización de membranas celulares en ambientes anhidrobióticos, permitiendo la sobrevivencia de organismos bajo tales condiciones (Crowe y Crowe, 1984; 1992; Wiemken, 1990). En levaduras, sin embargo, se debate actualmente si la trehalosa es un agente de protección o compuesto de reserva (Wiemken, 1990). La termotolerancia en levaduras, por ejemplo, dependería

exclusivamente de trehalosa solo durante los primeros momentos del estrés térmico. Para una termoprotección mantenida en el tiempo, se requerirían proteínas inducidas específicamente por el estrés térmico (Nwaka y cols., 1994). El contenido del disacárido no correlacionó con la resistencia de las esporas aéreas y sumergidas, sugiriendo la participación de otros factores. En las esporas aéreas, los niveles de trehalosa presentes podrían ser suficientes para efectos de mantención de la viabilidad dependiendo de su localización subcelular (Crowe y Crowe, 1984; 1992).

Por otro lado, la presencia específica de la capa externa de la pared de la espora fue particularmente significativa, en relación a la resistencia de estas células. La capa externa de la pared (W_2) es la primera en ser sintetizada durante la ontogenia de las esporas aéreas, desaparece en la zona de emergencia del tubo germinativo y está ausente de la hifa. Así, W_2 sería la primera defensa de la espora contra agentes externos y podría constituir un factor crítico de viabilidad y longevidad. El hecho que las esporas sumergidas se observen colapsadas en los análisis de microscopía de barrido (Figura 10B) guarda relación con lo anterior. Además, se ha observado que esporas producidas en medios líquidos bajo condiciones de cultivo que inducen la ausencia de la pared externa, tienen una baja viabilidad inicial, la cual no es mantenida durante el almacenamiento (Agosin y cols., 1995).

Las esporas producidas en medios líquidos, por su parte, fueron morfológica, bioquímica y funcionalmente diferentes de aquellas producidas por micelio aéreo. La capacidad de captar colorantes, el tamaño y la presencia de organelos en las esporas sumergidas concuerdan con las características de una célula metabólicamente activa. Estas se asemejan a las de una spora en germinación (Ekundayo y Carlile, 1967; Rosen y cols., 1974). Generalmente, la germinación hace que se pierdan ciertas características iniciales de la spora (Van Etten y cols, 1983), como por ejemplo la termoresistencia en el caso de *T. viride* (Spiegel y cols., 1975).

Por lo tanto, las esporas producidas sobre tejido aéreo, poseerían mejores atributos como agente de biocontrol constituyendo, entonces, el propágulo más adecuado para aplicar *T. harzianum* como biopesticida.

La hidrofobicidad fue una de las características diferenciales entre ambas esporas que resultó de gran interés por las ventajas comparativas que tal propiedad le conferiría a las esporas aéreas. En efecto, se ha propuesto que la hidrofobicidad protegería las esporas contra deshidratación debido a la repelencia al agua, serviría para dispersar las esporas en el aire (Beever y Dempsey, 1978) y favorecería la adhesión de las esporas a superficies hidrofóbicas (Boucias, 1988, Doss y cols., 1993). Esto último, repercutiría en una rápida y efectiva adhesión sobre hojas, frutos y

otros sustratos para una posterior colonización (Doss y cols., 1993; Gareth, 1994).

Hasta la fecha, la hidrofobicidad había sido relacionada con un tipo especial de estructura conocida como "rodlets". Este tipo de estructura no fue encontrada en las esporas aéreas de *T. harzianum*. En ciertos casos, como el descrito para el dermatofito *Trichophyton mentagrophytes* (Hashimoto y cols., 1976), tales estructuras han podido ser observadas solo al criofracturar las muestras, sugiriendo algún tipo de inestabilidad a temperatura ambiente. En el caso del patógeno del tracto respiratorio humano *Coccicoides imminitis* (Cole, 1986), se encontró localizado en la interfase entre las capas externas e internas de la pared. Los "rodlets" tendrían una naturaleza proteica (Hashimoto y cols., 1976; Beever y cols., 1979; Cole y Pope 1981,) y se han asociado con la presencia de hidrofobinas de clase I (Wessels, 1994). Es por lo tanto factible, que la ausencia de tales estructuras en las esporas de *T. harzianum* se deba a la ausencia de tal tipo de proteínas. Esto concuerda con el hecho de detectar en las esporas del hongo en estudio, proteínas con características similares a las hidrofobinas de clase II (Wessels, 1994).

Varios hechos apuntan a la presencia de hidrofobinas de clase II en esporas aéreas de *T. harzianum*. Las extracciones acuosas de compuestos asociados a la pared externa y la espuma de los medios de cultivo en donde se produce la esporulación, presentan un gran

número de fibras o "agujillas" cristalinas (no mostrado) tales como las observadas en extractos de ceratoulmina (Takai y cols., 1980; Russo y cols., 1982). Tres proteínas extraídas de las esporas (P18, P10 y P8) están inmunológicamente relacionadas con las hidrofobinas de *T. reesei*. Tales proteínas mostraron propiedades de solubilidad similares a las observadas para ceratoulmina y criparina (Russo y cols., 1982; Carpenter y cols., 1992). Genéticamente, *T. harzianum* poseería varios genes homólogos a *hfb2* de *T. reesei* (Figura 16A). Uno de tales genes, fue aislado y se sobreexpresa fuertemente bajo condiciones de esporulación (Figuras 16B, 17-19).

La plena identificación de P18, P10 y P8 como hidrofobinas se podrá realizar al disponer de la secuencia de las mismas. La determinación de la secuencia nucleotídica del gen clonado de *T. harzianum* homólogo a *hfb2* permitirá una fehaciente identificación tanto del gen mismo como el de su putativo producto como hidrofobinas. En *T. reesei*, *hfb2* codificaría para una proteína con una masa molecular, deducida de la secuencia del gen, de 7.2 kDa (Nakari y cols., 1995b). Es probable entonces que el gen clonado codifique para alguna de las proteínas de menor masa molecular, P8 o P10. Recientemente se obtuvieron los primeros resultados de los análisis de la secuencia amino terminal de P18 y P10 (13 y 9 residuos respectivamente, gentilmente realizado por Nisse Kalkkinen, Universidad de Helsinki, Finlandia). Para P8 no fue posible obtener tal información por encontrarse químicamente

bloqueada. Para ambas, las secuencias fueron diferentes y la comparación con otras hidrofobinas no arrojó similitud. Solo la disponibilidad de un mayor número de residuos permitirá realizar comparaciones más concluyentes.

La relación entre las proteínas P18, P10 y P8 no fue analizada en detalle en este trabajo. Los resultados de esta tesis indican que al menos P18 no representaría una forma dimérica de las proteínas más pequeñas. Las putativas hidrofobinas podrían representar productos de diferentes genes o diferentes modificaciones de una sola proteína. Debido a que solo un gen de hidrofobina homólogo a *hfb2* se expresa durante la esporulación, una sola proteína de tal tipo debería estar presente. Las secuencias amino terminales de P18 y P10 fueron diferentes, indicando que corresponderían a péptidos diferentes. Estos podrían originarse por proteólisis de algún precursor. Tal situación pareciera darse en *T. reesei*. En efecto, de las tres proteínas extraídas con ACN/TFA desde las esporas solo las dos de mayor masa molecular reaccionan con el anticuerpo antiHFB1 (Nakari y cols., 1995b; ver Figura 12). Estas últimas, poseen idéntica secuencia amino terminal, indicando que corresponderían a la misma proteína. Para el caso de *T. harzianum*, la reacción cruzada de las putativas hidrofobinas con el anticuerpo antiHFB1 indica la presencia de epítopes en común y por lo tanto cierta relación entre las proteínas. Si P18 y P10 derivaran de la misma proteína, la modificación del precursor debería ocurrir intracelularmente debido a que no se detectó una proteína de alta movilidad

electroforética y alta reactividad con los anticuerpos en las extracciones de las esporas. La elevada antigenicidad de P18 podría involucrar residuos glicosídicos. La presencia de tales residuos ha sido invocada en aquellos casos en que las hidrofobinas presentan diferencias entre su masa molecular deducida de la secuencia del gen y la determinada mediante métodos electroforéticos (Wessels y cols., 1991, Zhang y cols., 1994). La presencia de señales de glicosidación en algunos genes de hidrofobinas, sustentan tal presunción (Zhang y cols., 1994).

La detección de las proteínas P18, P10 y P8 estuvo siempre ligada con las esporas o condiciones de esporulación. Mediante la técnica de Western, usando suero antiHFB1, tales proteínas no se detectaron en extracciones de micelio aéreo o sumergido. El hecho que el gen clonado de *T. harzianum* homólogo a *hfb2* haya manifestado un bajo pero significativo nivel de expresión bajo condiciones vegetativas, sugiere que alguna de las proteínas no serían específicas de la spora, pero cumplirían un rol importante en ellas. Esto concuerda con no detectar las putativas hidrofobinas en micelio vegetativo, lo que probablemente se deba a que se encontrarían a niveles muy bajos.

La expresión del gen clonado de *T. harzianum* homólogo a *hfb2* ante limitación de nutrientes concuerda con que tales condiciones, generalmente, inducen la esporulación en hongos (Dahlberg y Van Etten, 1982). Los genes de hidrofobinas *ssgA* de

Metharhizium anisopliae (St. Leger y cols., 1992), *mpg1* de *Magnaporthe grisea* (Talbot y cols., 1993) y *eas* de *Neurospora crassa* (Sokolovsky y cols., 1992; Kaldenhoff y Russo, 1993) presentan similar tipo de regulación. El hecho que en tales experimentos, no todas las condiciones de limitación se asociaran con altos niveles de esporulación, radicaría en el hecho que tal proceso dependería de las relación carbono/nitrógeno del medio (Agosin y cols., 1995). La baja pero significativa y transiente expresión del gen clonado de *T. harzianum* homólogo a *hfb2* en el medio con glucosa y nitrógeno resulta intrigante. Este comportamiento podría estar relacionado con el estrés que significa para el hongo cambiar de un medio nutricionalmente enriquecido a otro que representa una condición mínima.

En *T. harzianum* P18, P10 y P8 se encontrarían en dos fracciones diferentemente asociadas a las esporas aéreas. Tal característica no ha sido descrita en otros sistemas y constituiría una particularidad de *Trichoderma*. De hecho, se ha observado una situación similar en *T. reesei* (G. Muñoz y T. Nakari, datos no publicados). Esta diferencial asociación se podría relacionar con un rol funcional y estructural de tales proteínas.

Así, una fracción tendría una asociación más débil y por ende más lábil con la pared de la spora, pero sería la que contribuye al carácter hidrofóbico. En efecto, la extracción con agua y solventes medianamente polares extraen tanto el carácter hidrofóbico como

las putativas hidrofobinas de las esporas. Generalmente, la hidrofobicidad ha sido relacionada con la presencia de una hidrofobina de clase I (Wessels, 1994). La presencia de más de una hidrofobina en un microorganismo solo ha sido descrita para *S. commune* (Schuren y Wessels, 1990), *T. ressei* (Nakari y cols, 1995b) y recientemente *A. nidulans* (Stringer y Timberlake, 1995). Solo en este último, dos hidrofobinas de clase I, RODA y DEWA, participarían en el carácter hidrofóbico de las esporas. Por lo tanto, *T. harzianum* podría representar el primer caso en el que más de una hidrofobina de clase II están involucradas con la hidrofobicidad.

Las putativas hidrofobinas de *T. harzianum*, junto con otros componentes superficiales, podrían mediar la adhesión a superficies hidrofóbicas como las presentes en el la filósfera. En *S. commune*, la adhesión del hongo a una superficie hidrofóbica como Teflón® estaría mediada por la hidrofobina SC3. En este hongo, la proteína fue localizada en la interfase pared/Teflón®, mientras que la unión a esta superficie fue bastante reducida en un mutante del gen *sc3* (Woesten y cols., 1994b). La identificación y aislamiento de los genes que codifican para P18, P10 y P8 permitirán elucidar fehacientemente la función propuesta.

Los primeros ensayos para detectar P18, P10 y P8 en la superficie de las esporas, utilizando técnicas inmunológicas, no fueron exitosos. Los anticuerpos no reconocerían las proteínas en su forma nativa o bien éstas se encuentran bajo una forma o

estructuración que dificulta el reconocimiento por el anticuerpo. Por otro lado, ceratoulmina y criparina están presentes en estructuras aéreas de los hongos que las producen (Svircev y cols., 1988; Carpenter, 1992). En *O. ulmi* se observa un material tipo "tela de araña" que cubre las hifas y las esporas (Svircev y cols., 1988). Este material es similar al observado en las esporas aéreas de *T. harzianum* y que está ausente en las sumergidas (Figura 9). Es probable, entonces, que las hidrofobinas de clase II se encuentren en las superficies del tejido fúngico formando parte de tal tipo de material.

Las proteínas P18 y P10 se encontrarían, además, presentes en las esporas aéreas de *T. harzianum* en una segunda fracción extraíble solo con tratamientos drásticos. En esta fracción, ambas proteínas cumplirían un rol más bien estructural. Podrían estar inmersas dentro de la pared externa o interaccionando más fuertemente con otros componentes de la misma. Esto disminuye parcialmente el carácter hidrofóbico, como lo indicó la hidratación más lenta de las esporas extraídas con agua comparadas con las sumergidas en el ensayo de hidrofobicidad.

Las características topológicas y bioquímicas de P18, P10 y P8 llevan a proponer que durante la esporulación aérea estas proteínas junto a otros componentes de la pared, se ensamblarían formando una gruesa pared externa. Esta pared mantendría aislada a la espora del medio ambiente, facilitando el establecimiento y la

mantención del estado latente. Por otro lado, le otorgaría a las esporas aéreas una propiedad funcional como la hidrofobicidad. Esto último, facilitaría su dispersión aérea y adhesión a ciertas superficies y sustratos. Al producirse la esporulación en medios líquidos, la agitación del medio y la solubilidad de los componentes de la pared externa facilitarían que éstos se liberen al medio. Esto generaría una espora con una delgada pared externa. Tal espora, podría fácilmente interaccionar con el medio externo, lo que podría activar el metabolismo germinativo. Las esporas sumergidas enfrentan largos tiempos de exposición a medios de cultivo que no soportan crecimiento (Agosin y cols., 1995). Esto conduciría al desarrollo de un metabolismo particular, en donde podrían ocurrir reacciones de deterioro celular o senescencia, como los observados en granos y semillas (Stanley, 1991). Esto, afectaría la viabilidad inicial y la longevidad de las esporas sumergidas.

Por lo tanto, la modalidad de cultivo afecta notablemente las características de las esporas de *T. harzianum*. La modalidad de cultivo sobre sustrato sólido sería clave para producir esporas con alta viabilidad y longevidad. Las esporas así producidas, no requerirían de formulaciones muy sofisticadas para facilitar su establecimiento y mantenerse viable en la filósfera, teniendo por lo tanto una mayor persistencia en el campo.

Sin embargo, para que las esporas de *T. harzianum* funcionen eficazmente como biopesticidas, éstas deben ser capaces de expresar su actividad antagónica. Esto implica desarrollar rápida y exitosamente la germinación. Es por esto que, una parte de esta tesis consistió en estudiar el comportamiento germinativo de las esporas aéreas. Para esto, se realizaron estudios *in vitro*, como una primera aproximación para la comprensión de lo que pudiera acontecer en el campo.

A este respecto, lo primero fue determinar las condiciones óptimas para el desarrollo del tubo germinativo en la cepa P1. La germinación fue óptima a pH 4.0, lo que concuerda con el hecho que *Trichoderma*, en la naturaleza, se encuentra usualmente en suelos ácidos (Danielson y Davey, 1973; Eveleigh, 1985). Además, la cepa P1 ha mostrado, en cultivos líquidos, crecer mejor a valores bajos de pH (Agosin y cols., 1995), sugiriendo que tal condición favorecería el estado vegetativo. El rango óptimo encontrado para la temperatura, a su vez, correlaciona con el hecho que la mayoría de las especies de *Trichoderma* se encuentran en regiones templadas (Eveleigh, 1985). El efecto negativo que tuvo sobre la germinación valores de actividad de agua inferiores a 0.98, significaría que las esporas del hongo requerirían de una alta humedad para germinar. Esta puede ser alcanzada solamente durante lluvias o lloviznas, neblina y rocío, particularmente en el suelo, habitat natural de este género.

La actividad del agua, comunmente utilizada tanto para evitar contaminación microbiológica como para mantener inóculos viables, se relaciona con la humedad relativa (Han-Hagerdal, 1986). Esta última, a su vez, presenta grandes variaciones bajo condiciones de campo al igual que la temperatura (Magan, 1988; Arauz y Sutton, 1989). La temperatura y la humedad relativa serían los factores abióticos más gravitantes sobre el crecimiento de los microorganismos en el ambiente.

Para sostener la germinación, nutricionalmente, las esporas aéreas requirieron de la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno. Tal tipo de requerimientos habían sido descritos para la germinación de esporas en otras especies de *Trichoderma* (Martin y Nicholas, 1970; Danielson y Davey, 1973; Spiegel y cols., 1975; Jakson y cols., 1991). Esta dependencia indica que tales esporas no contendrían almacenados compuestos endógenos a niveles suficientes para obviar la suplementación exógena. Por lo tanto, nutrientes como los mencionados deberían ser incluidos en la formulación de preparados de esporas.

Los resultados indican que los nutrientes exógenos, además de sustratos, podrían actuar como señales desencadenando de alguna manera el desarrollo de actividad metabólica, sin culminar en la aparición del tubo germinativo. Similar situación ha sido descrita en *N. crassa* (Bonen y Brambl, 1983) y levaduras (Thevelein, 1991), por lo que la existencia de sensores específicos para tales

compuestos que desencadenen, al menos transientemente la actividad metabólica es probable. Para el estudio de este fenómeno es importante disponer de un marcador temprano de la germinación.

Aún bajo las condiciones óptimas, la germinación se desarrolló en un largo lapso de tiempo. Esto indica que las esporas aéreas no están preparadas endógenamente para desarrollar un rápido proceso germinativo. Dos aspectos podrían estar involucrados en tal comportamiento, uno de orden ultraestructural y el otro relacionado con la disponibilidad de reservas endógenas.

Durante las primeras 4 h de germinación se observaron una serie de cambios en cuanto al aspecto y presencia de organelos celulares lo que derivó finalmente en la aparición de una espora con el aspecto típico de cualquier célula activa. Los cuerpos electrodensos situados preferentemente en la periferia del citoplasma han sido previamente observados en esporas de *Botrytis cinerea* (Buckley y cols., 1966; Gull y Trinci, 1971) y *Trichoderma viride* (Rosen y cols., 1974). A tales inclusiones subcelulares, se les ha asignado un rol de reserva de material lipoproteico para el ensamble de organelos membranosos durante la germinación. La desaparición temprana de estos cuerpos durante la germinación del hongo en estudio, guarda relación con tal rol. Concomitantemente, se observó una reducida actividad metabólica global (Figuras 21 y 22). Esto indicaría una transición citológica de la espora desde el estado latente hacia otro intermedio, que pueda sustentar la

actividad requerida para el establecimiento del estado vegetivo, objetivo final de la germinación.

En cuanto a la reserva de sustratos endógenos, se encontró que la disponibilidad de aminoácidos pareciera ser un aspecto clave. Efectivamente, la germinación ocurre sincrónica y rápidamente en medios con peptona o en presencia de algunos aminoácidos como fuentes de nitrógeno del medio de germinación. Por otro lado, en los experimentos para analizar la síntesis de proteína, se encontró que casi la totalidad de la leucina radioactiva que ingresa a la espora es incorporada en la fracción proteica (Figura 23). Los niveles de aminoácidos libres totales fueron de alrededor del 0.8% del peso seco de la espora y se mantuvieron relativamente constantes durante la germinación, indicando una alta demanda de tales compuestos. Interesantemente, los niveles de aminoácidos en *T. harzianum* son 3 veces más bajos que el reportado en conidias de *N. crassa*, hongo cuya germinación ocurre entre 4 a 5 h (Schmidt y Brody, 1975; Bonen y Brambl, 1983), tiempo tres veces menor que el de *T. harzianum*. Aunque a bajos niveles, los principales aminoácidos acumulados en las fialoconidias del hongo en estudio fueron glutamina y glutamato, similar a la descrito en esporas con rápida germinación (Schmidt y Brody, 1975; Klein y cols., 1990).

La vía de utilización del glutamato acumulado en *T. harzianum* fue diferente a la descrita para *N. crassa* (Schmidt y Brody, 1975). En efecto, en los análisis de aminoácidos no se detectó la presencia

de γ -aminobutirato ni significativos aumentos en alanina, sino que se incrementó el contenido de glutamina concomitante a la disminución de glutamato. Esto indicó actividad de glutamina sintetasa, que fue detectada aún en esporas sin germinar. Según los niveles de transformación observados, se transformarían alrededor de 17 μ moles del aminoácido por gramo de espora. Se requerirían similares concentraciones de amonio y ATP. Este último compuesto debería, por lo tanto, estar presente en las esporas, indicando una disponibilidad de energía. Altos niveles de ATP han sido detectados en esporas de *N. crassa* (Slayman, 1973), *D. discoideum* (Klein y cols., 1990) y levaduras (Thevelein y cols., 1984).

El significado fisiológico de la síntesis temprana de glutamina durante la germinación es por el momento desconocido. Se podría especular acerca de una señal secundaria para desencadenar o preparar el desarrollo de otros eventos. Para glutamina, ha sido propuesto un rol de correpresor en el sistema de represión catabólica por nitrógeno, indicando intracelularmente el nivel de material nitrogenado externo (Marzluf, 1981). Desde un punto de vista metabólico, el rápido funcionamiento del ciclo gln/glu consumiría ATP y NADPH, generado o preservado en la espora, inhibiendo el desarrollo de otros eventos dependientes de energía y poder reductor. Estos últimos, quedarían disponibles para otras actividades al satisfacer glutamina las demandas celulares de aminoácidos (Mora, 1991). Esto podría explicar el largo período -4

h- en que se aprecia una reducida actividad metabólica, antes que ésta se manifieste a tasas exponenciales.

La preservación de glutamina sintetasa en las esporas latentes de *T. harzianum* no deja de llamar la atención. Esto constituye una particularidad de esta especie y podría ser una generalidad para el género. En *N. crassa*, en cambio, esta enzima se sintetiza *de novo* desde el comienzo de la germinación, no encontrándose su RNAm en la población de aquellos RNA preservados (Hansberg y cols., 1979). Resultados preliminares indican que glutamina sintetasa se encontraría asociada a la fracción microsomal en las esporas no germinantes de *T. harzianum*. En otros hongos, solo se ha descrito una forma citosólica (Palacios, 1976; Mora, 1991). Esto podría relacionarse con la forma particular bajo la cual es preservada, pudiendo ser liberada durante la fase vegetativa.

La actividad de glutamina sintetasa se manifestó *in vivo* incluso en ausencia de nutrientes. Esto indica que el desarrollo de ciertas actividades de la germinación requerirían solo la presencia de agua. Si suponemos que las esporas aéreas de *T. harzianum* se encuentran inicialmente en un estado anhidrobiótico, la entrada de agua permitiría que se establezcan las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de actividades enzimáticas y reacciones químicas en general (Fahey y cols., 1978).

La entrada de agua a la espora, así como de nutrientes exógenos, se dificultaría por la hidrofobicidad superficial y por el grosor de la pared externa de las esporas aéreas de *T. harzianum*. Por lo tanto, para que se induzca o desencadene la germinación los componentes hidrofóbicos deberían liberarse y el grosor de la pared externa reducirse. Esto podría ser considerado como la activación de la espora, tal como para otros sistemas lo son el shock térmico o el uso de compuestos químicos específicos (Van Etten y cols., 1983). Si bien en los experimentos descritos en esta tesis, el "adelgazamiento" de la pared externa concomitante a la pérdida de la hidrofobicidad fue un artefacto experimental, en la naturaleza podría ocurrir al establecerse un ambiente con alta humedad o agua libre adyacente a la espora. Esto podría llevarse a cabo gracias a la lluvia o neblina, lo que sumado a la agitación ocasionada por goteo y el viento, facilitarían la liberación de las proteínas más superficiales de interacción débil con la pared.

Una vez activada la espora, el desarrollo de los diferentes eventos implicados va a depender de las condiciones exógenas. Si estas últimas son apropiadas, los eventos germinativos se desarrollarían secuencialmente hasta la aparición del tubo germinativo. Los resultados de esta tesis concuerdan con lo propuesto por Brambl (1981), en el sentido que la germinación no dependería de un solo estímulo, sino que se desarrollaría gracias a la interacción e interdependencia de diversas respuestas metabólicas frente a múltiples estímulos que inician la germinación.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten definir un cuadro sobre el comportamiento de las esporas aéreas de *T. harzianum* como el que se presenta en la Figura 27. Las esporas aéreas serían producidas bajo un estado de latencia, sin actividad metabólica detectable y separadas del medio por una gruesa pared (estado I). Sobre la pared, se encontrarían componentes que le conferirían cierta hidrofobicidad a las esporas. Esto último, le otorgaría resistencia a las condiciones externas, facilitaría su dispersión en el aire y adhesión a superficies tales como hojas y frutos. La liberación de los componentes hidrofóbicos más externos de la pared permitiría la captación de agua y nutrientes del medio externo (estado II) desencadenando algunos eventos germinativos. Durante las primeras 4 h siguientes de tal activación, se desarrolla una fase de transición (estados II al III), o reorganización ultraestructural, hacia un estado metabólicamente activo de la germinación (estado III). Durante el estado III se desarrollan una serie de eventos en secuencia, como síntesis de proteína y respiración para culminar con la aparición del tubo germinativo (estado IV). Esto implica el establecimiento de la fase vegetativa pudiendo expresarse el antagonismo (estado V).

Dentro de este esquema, las esporas producidas bajo condiciones de cultivo líquido se encontrarían distribuidas en una población heterógena, comprendiendo los estados III al V.

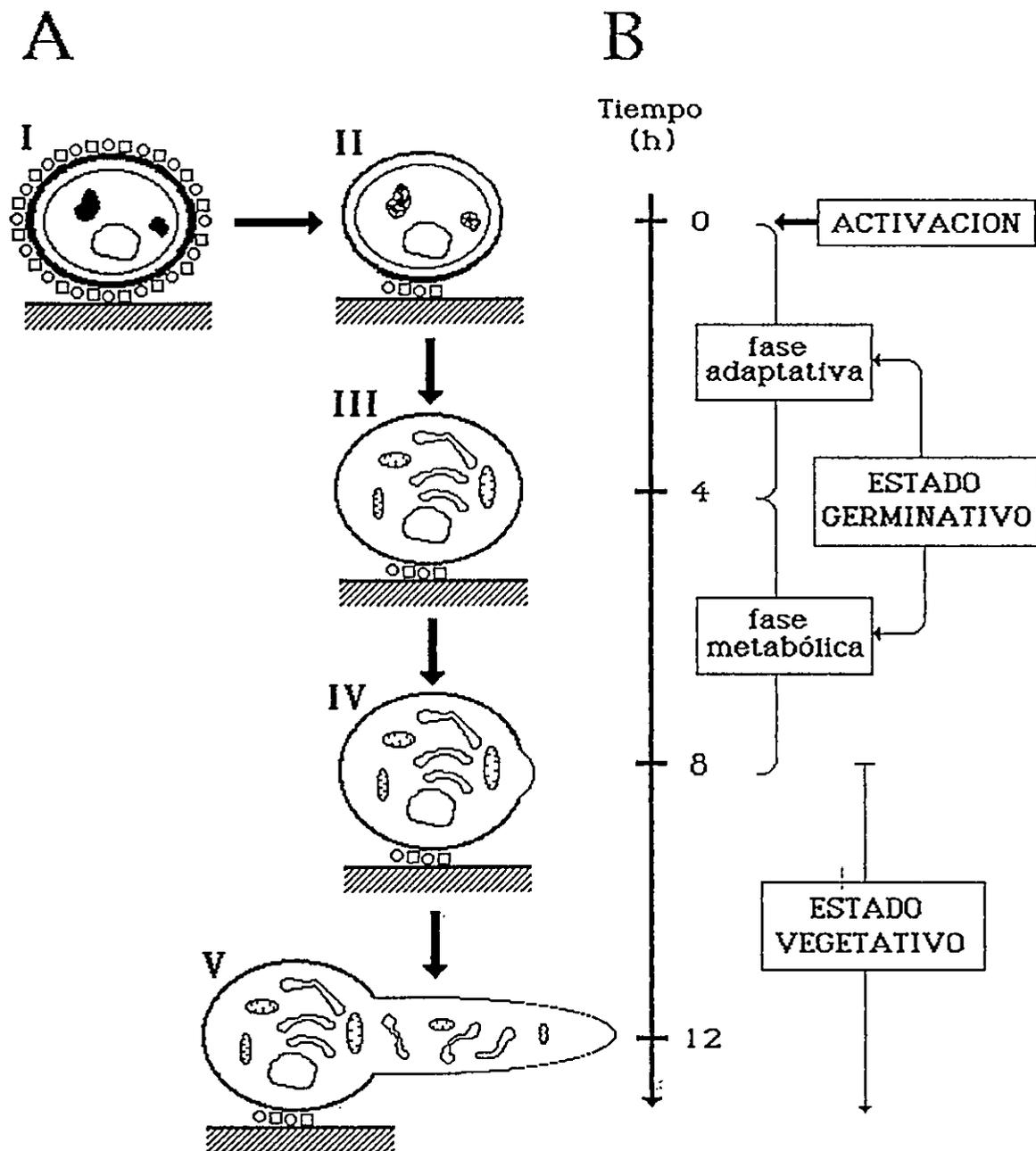


Figura 27. Resumen esquemático del comportamiento de las esporas de *Trichoderma harzianum* durante su estado de latencia, inducción y desarrollo de la germinación. A, evolución morfológica. B, división de las fases y estados de la germinación. La escala de tiempo presentada se relaciona con las condiciones óptimas de germinación. Cuadrados y círculos representan componentes hidrofóbicos de superficie. Ver los detalles en el texto.

5. PROYECCIONES.

Con respecto a las putativas hidrofobinas ligadas a la espora :

- El análisis de la secuencia del gen clonado permitirá relacionarlo con las hidrofobinas e identificar su producto.
- La inactivación de tal gen permitirá evaluar el aporte de la proteína sobre propiedades de la espora como hidrofobicidad, longevidad y estructura de la pared externa.
- Por su ubicación externa serviría como modelo de estudio para la ubicación de proteínas en la pared externa. Esto podría permitir ubicar en la superficie de la espora enzimas activas contra el patógeno a controlar, potenciando el efecto antagónico.

Con respecto a la presencia de glutamina sintetasa en la espora :

- Aparece como un sistema para estudiar la acumulación de factores específicos dentro de la espora. Esto permitiría acumular y analizar el potencial de algunos factores con la longevidad.
- Debido a su asociación con la fracción microsomal en la espora latente, aparece de interés evaluar si permanece bajo tal asociación o si es liberada durante el establecimiento de la fase vegetiva.

6. CONCLUSIONES.

1. La modalidad de cultivo empleada para producir esporas influye sobre las propiedades de las mismas. Las esporas aéreas poseerían mejores atributos para aplicar *T. harzianum* como biopesticida.
2. La pared externa, específica de las esporas y notablemente más gruesa en las aéreas, contendría factores que otorgarían el carácter hidrofóbico a las mismas. Esto podría relacionarse con la longevidad y adhesión a determinadas superficies.
3. Las esporas aéreas poseerían al menos tres proteínas tipo hidrofobinas de clase II asociadas a la pared externa que le podrían otorgar el carácter hidrofóbico. Tales proteínas están presentes en dos fracciones diferencialmente asociadas a las esporas aéreas. Se encuentran ausentes en las esporas de medio líquido pero se acumulan en el medio de cultivo.
4. Las esporas aéreas de *T. harzianum* no tendrían una constitución endógena, en términos ultraestructurales y de precursores, suficiente para sostener una rápida germinación.

5. La activación de la espora requiere de diversos estímulos como la liberación de una fracción de las proteínas externas de la pared, condiciones levemente ácidas, altas temperaturas y humedad, además de la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno.
6. Los eventos metabólicos involucrados en la germinación se desarrollarían en forma secuencial para establecer el estado vegetativo.
7. La enzima glutamina sintetasa, preservada en la espora, daría cuenta de la temprana metabolización de glutamato a glutamina. Este evento puede ser activado bajo condiciones que no sustentan germinación morfológica.

7. REFERENCIAS

- AGOSIN, E., VOLPE, D., MUÑOZ, G.A., SAN MARTIN, R., y CRAWFORD, A. (1995). Effects of culture conditions on spore shelf life of *Trichoderma harzianum*. (enviado para publicación a Biological Control)
- ANDREWS, J.H. (1992). Biological control in the phyllosphere Ann. Rev. Phytophatol. 30:603-635.
- ARAUZ, L.F. y SUTTON, T.B. (1989). Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria obtusa*. Phytophatology 79:667-6674.
- AUGER, J. (1983). La pudrición gris en la vid, *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. Algunos aspectos epidemiológicos para su control. ACONEX 4: (Mayo/Junio/Julio/Agosto):15-18
- BEEVER, R.S. y DEMPSEY, G.P. (1978). Funtion of rodlets on the surface of fungal spores. Nature 272: 608-610.
- BELANGER, R.R., DUFOUR, N., CARON, J., y BENHAMOU, N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* : indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. Bicontrol Science and Technology 5:41-53.
- BOLAND , M.J. y BENNY A.G. (1971). Enzyme in nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dpendent glutamate synthase from lupine nodules. Eur. J. Biochem 79: 355-362.
- BONNEN , A., y BRAMBL, R. (1983). Germination physiology of *Neurospora crassa* conidia. Exp Mycol. 7:197-207

BOUCIAS, D.B., PENDLAND, J.C. y LATGE, J.P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1795-1805.

BRAMBL, R. M. (1975). Characteristics of developing mitochondrial genetic and respiratory functions in germinating spores. *Biochim Biophys Acta* 396: 175-186.

BRAMBL, R. M. (1981). Respiration and mitochondrial biogenesis during fungal spore germination. En: *The Fungal Spore. Morphogenetics Controls.* (G. Turian & H.R. Hohl eds.). London and New York: Academic Press. Pags. 585-604.

BRAMBL, R.M. y VAN ETTEN, J.L. (1970). Protein synthesis during fungal spore germination. V. Evidence that the ungerminated conidiospores of *Botryodiplodia theobromae* contain messenger ribonucleic acid. *Arch Biochem Biophys.* 137: 442-452.

BRAMBL, R.M., DUNKLE, L.D., Y VAN ETTEN, J.L. (1978). Nucleic Acid and Proteins synthesis during fungal spore germination. En: *The Filamentous fungi III: Developmental Biology* (J.E. Smith & D.R. Berry, eds.). Edward Arnold. Págs. 95-118.

BRAMBL, R., PLESOFKY-VIG, N., HAMMETT, J.R., y RUSSELL, P.J. (1987). Preserved polyadenylated ribonucleic acid in dormant conidia of *Neurospora crassa* and new RNA synthesis during spore germination. *Exp Mycol.* 11:317-330.

BRODY, S. (1981). Genetic and biochemical studies on *Neurospora* conidia germination and formation. En : *The Fungal Spore. Morphogenetics Controls.* (G. Turian & H.R. Hohl eds.). London and New York: Academic Press. Pags. 605-626.

BUCKLEY, P.M., SJAHOLM, V.E. y SOMMERS, N.F. (1966). Electron microscopy of *Botrytis cinerea* conidia. *J. Bacteriol.* 91: 2037-2044.

CARPENTER, C.E., MUELLER, R.J., KAZMIERCZAK, P., ZANG, L., VILLALON, D.K. y VAN ALFEN, N.K. (1992). Effect of a virus on accumulation of a tissue-specific cell-surface protein of the fungus *Cryphonectria (endothia) parasitica*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 4:55-61

COHEN, S.A., MEYS, M. y TARVIN, L.T. (1989). The Pico•Tag Method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis. WMO2, Rev.1. Waters, Division of MILLIPORE.

COLE, G.T. (1986). Models of cell differentiation in conidial fungi. *Microbiol. Rev.* 50: 95-132.

COLE, G.T. y POPE, L.M. (1981). Surface wall components of *Aspergillus niger* conidia. En: *The Fungal Spore. Morphogenetics Controls.* G. Turian & H.R. Hohl (eds.). London and New York: Academic Press. Pags. 195-218.

COOPERMAN-SOLLOD, C., JENNS, A.E. y DAUD, M. (1992). Cell surface redox potential as a mechanism of defense against photosensitizers in fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:444-449.

COTTER, D.A. y RAPER, K.B. (1966). Spore germination in *Dyctiostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 880-887.

COTTER, D.A. (1981). Spore activation. En: *The Fungal Spore. Morphogenetics Controls.* G. Turian & H.R. Hohl (eds.). London and New York: Academic Press. Pags. 385-411.

CROWE, J.H. y CROWE, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol.* 54 :579-599.

CROWE, J.H. y CROWE, L.M. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose. *Science* 225:701-703.

DAHLBERG, K.R y VAN ETTEN, J.L. (1982). Physiology and Biochemistry of fungal sporulation. *Ann Rev. Phytopathol.* 20: 281-301.

DAVIES, R.H., y SERRES, F.J. (1970). Genetics and Microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.* 17 A: 79-143.

DANIELSON, R.M. y DAVEY, C.B. (1973). Effects of nutrients and acidity on phyalospore germination of *Trichoderma in vitro*. *Soil Biol. Biochem.* 5:517-524.

- DOSS, R.P., POTTER, S., CHASTAGNER, A. y CHRISTIAN, J. (1992). Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl Environ Microbiol.* 59: 1786-1791.
- DONS, J.M., SPRINGER, J. de VRIES, S.C. WESSELS, J.G.H. (1984). Molecular cloning of a gene abundantly expressed during fruiting body initiation in *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol* 157:802-808.
- ELAD, Y., y KIRSSNER, B. (1993). Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* modified by abiotic conditions. *Phytoparasitica* 21:303-313.
- EKUNDAYO, J.A. y CARLILE, M.J. (1964). The germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*; spore swelling and germ-tube emergence. *J. Gen. Microbiol.* 35: 261-269.
- ENNIS, H.L., GIORDA, R., OHMACHI, T, SHAW, D.R. 1988. Characterization of genes that are developmentally regulated during *Dictyostelium discoideum* spore germination. *Develop. Gen.* 9:303-313.
- EVELEIGH, D.E. (1985). *Trichoderma*. En: *Biology of Industrial Microorganisms*. A.L. Demain & N.A. Solomon (eds.). Menlo Park, CAL; The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc. Pags. 487-509.
- FAHEY, R.C., MIKOLAJCZYK, S.D. y BRODY, S. (1978). Correlation of enzymatic activity and thermal resistance with hydration state in ungerminated *Neurospora crassa* conidia. *J. Bacteriol.* 135: 868-875.
- FENN, P. y KIRK, T.K. (1981). Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporum*. *Arch. Microbiol.* 130: 59-65.
- FINCHAM, J.R.S. (1950). Mutant strains of *Neurospora* deficient in aminating ability. *J. Biol. Chem.* 181: 61-73.
- FURCH, B. (1981). Spore germination: heat mediated events. En: *The Fungal Spore. Morphogenetics Controls*. G. Turian & H.R. Hohl (eds.). London and New York: Academic Press. Pags. 413-433.

GARETH, E.B. (1994). Fungal Adhesion. *Mycol Res.* 98:961-981.

GERVAIS, P., MOLIN, P., GRAJEK, W., y BENSOUSSAN, M. (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biothechnol. Bioengineering* 31: 457-463.

GOLDMAN, G.H., HAYES, CH. y HARMAN, G.E. (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *TIBTECH* 12:478-482.

GULL, K., y TRINCI, P.J. (1971). Fine structure of spore germination in *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* 68: 207-220.

GUTIERREZ, M.R. (1989) Fermentación en medio sólido. X curso internacional de Ingeniería Bioquímica. Escuela de Ingeniería Bioquímica. Facultad de Ingeniería. Universidad Católica de Valparaiso.

HAHN-HAGERDAL, B. (1986). Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme Microbiol Technol.* 8: 322-326.

HAMMILL, T.M. (1974). Electron microscopy of phialides and conidiogenesis in *Trichoderma saturnisporum*. *Am. J. Bot.* 61:15-24.

HANSBERG, W., ESPIN, G., PALACIOS, R. y SANCHEZ, F. (1979). Regulation of glutamine sintetase messenger ribonucleic acid in conidia of *Neurospora crassa*. *Develop. Biol.* 73:68-75.

HAO, R., y SCHMIT, C. (1993). Cloning of the gene for glutamate decarboxilase and its expression during conidiation in *Neurospora crassa*. *Biochem J.* 293:735-738.

HARMAN, G.E., JIN, X., STASZ, T.E. PERUZZOTTI, G. LEOPOLD A.C. y TAYLOR A.G. (1991). Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biol. Control* 1:23-28.

HASHIMOTO, T., WU-YUAN, C.D. y BLUMENTHAL, HJ. (1976). Isolation and characterization of the rodlet layer of *Trichophyton mentographytes* microconidial wall. *J. Bacteriol.* 127: 1543-1449.

HUMMLET, G., y MORA, J. (1980). NADH-dependent glutamate synthase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 127-133.

JACKSON, A.M., WHIPPS, J.M., LYNCH, J.M., y BAZIN, M.J. (1991). Effects of some carbon and nitrogen sources on spore germination, production of biomass and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistics to *Sclerotium cepivorum*. *Biocontrol Science and Technology* 1:43-51.

JIN, X., HARMAN, G.E., y TAYLOR, A.G. (1991). Conidial Biomass and dessication tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potential. *Biological Control.* 1:237-243.

KALDENHOFF, R., y RUSSO, V.E.A. (1993). Promoter analysis of the *bli-7/eas* gene. *Curr. Genet.* 24:394-399.

KLEIN, G., COTTER, D.A., MARTIN, J.B., y SATRE, M. (1990). A natural -abundance ^{13}C -NMR study of *Dictyostelium discoideum* metabolism. Monitoring of the spore germination process. *Eur. J. Biochem.* 193: 135-142.

KUBICEK, CH. P. (1987). Involvement of a conidial endoglucanase and a plasma-membrane-bound b-glucosidase in the induction of endoglucanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J. Gen Microbio.* 133:1481-1487.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

LEGER, R.J., STAPLES, R.C. y ROBERTS, D.W. (1992). Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 120:119124.

LEWIS, J.A. y PAPAVIDAS G.C. (1983). Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp in liquid and solid growth media. *Soil Biol Biochem* 15:351-357.

LISANSKY, S. (1989). Biopesticides: the next revolution? *Chemical & Industry.* Aug: 479-483.

- LEWIS, J.A. y PAPAVIDAS G.C. (1983). Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. in natural substrates. *Can J. Microbiol.* 30:1-7.
- LEWIS, J.A. y PAPAVIDAS G.C. (1991). Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop Protection* 10:95-102.
- MAGAN, N. (1988). Effects of water potential and temperature on spore germination and germ-tube growth *in vitro* and on straw leaf sheaths. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90: 97-107.
- MARTIN, J.F. y NICHOLAS, G. (1970). Physiology of spore germination in *Penicillium notatum* and *Trichoderma lignorum*. *Trans Brit. Mycol. Soc.* 55:141-148.
- MARZLUF, G.A. (1981). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.* 54:293-304
- MAYORGA, M.E. y TIMBERLAKE, W.E. (1992). The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wa* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. *Mol. Gen. Genet.* 235: 205-212.
- MULDER, G.H., y WESSELS, J.G.H. (1986). Molecular cloning of RNAs differentially expressed in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune* in relation to fruiting. *Exp. Mycol* 10:214-227.
- MORA, J. (1991) Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev.* 45:437-461.
- NAKARI-SETÄLÄ, T. ARO, N., KALKKINEN, N., ÄLATALO, E. y PENTILLÄ, M. (1995a). Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFB1. *Eur. J. Biochem.* En prensa.
- NAKARI-SETÄLÄ, T. ARO, N., ILLMEN, M., MUÑOZ, G., KALKKINEN, N., ÄLATALO, E. y PENTILLÄ, M. (1995b). Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei* : cloning and characterization of the *hfb2* gene (Enviado para publicación a *Eur. J. Biochem*)

- NWAKA, S., KOPP, M., BURGET, M., DEUCHLER, I., KIENLE, I., HOLZER, H. (1994). Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? 344:225-228.
- NICHOLSON, R.L. y MORAES, W.B.C. (1980). Survival of *Colletotrichum graminicola* : Importance of the spore matrix. *Phytopathology* 70:255-261.
- NICHOLSON, R.L., BUTLER, L.G. y ASQUITH, T.N. (1986) Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* 76:1315-1318.
- PALACIOS, R. (1976). *Neurospora crassa* glutamine synthetasa. Purification by affinity chromatography and characterization of subunit structure. *J. Biol. Chem.* 251:4787-4791.
- PAPAVIZAS, G.C. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol* 23:23-54.
- PORTER, K.R., KELLY, D., y F.J. ANDREWS. (1972). The preparation of cultured cell and soft tissues for scanning microscopy. En: *Proceedings of the Fifth Annual Stereoscan Colloquim.* Pags.1-(19).
- RAMALINGAM, R., BLUME, J.E., y ENNIS, H.L.(1992). The *Dictyostelium discoideum* spore germination-specific cellulase is organized into two functional domains. *J. Bacteriol.* 174:7834-7837.
- REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- ROSEN, D., EDELMAN, M., GALUN, E., y DANNON, D. (1974). Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma viride* : structural changes in mitochondria and other spore constituents during conidium maturation and germination. *J. Gen. Microbiol.* 83: 31-49.
- ROWE, W.R., RONZIO, R.A., WELLNER, V.P., y MEISTER, A. (1970). Glutamine synthetase (Sheep brain) *Methods Enzymol* 17A: 900-910.

- RUSSO, P.S., BLUM, F.D., IPSEN, J.D., ABUL-HAJJ, Y.J. y MILLER, W.G. (1982). The surface activity of the phytotoxin cerato-ulmin. *Can J. Bot.* 60: 1414-1422.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., y MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual. 2a Edición.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SCHMIDT, J.C. y BRODY, S. (1975). *Neurospora crassa* conidial germination: role of endogenous amino acid pools. *J. Bacteriol.* 124: 232-242.
- SCHUREN, F.H.J. y WESSELS, J.G.H. (1990). Two genes specifically expressed in fruiting dikarions of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene* 90:199-205.
- SCHUREN, F.H.J., ASEGEIRSDOTTIR, S.A., KOTHE, E.M., SCHEER, J.H.J., WESSELS, J.G.H. (1993). The Sc7/Sc14 gene family of *Schizophyllum commune* codes for extracellular proteins specifically expressed during fruit-body formation. *J. Gen. Microbiol.* 139:2083-90.
- SETLOW, P. (1988). Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function and degradation. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 319-338.
- SLAYMAN, C.L. (1973). Adenine nucleotide levels in *Neurospora*, as influenced by conditions of growth and metabolic inhibitors. *J. Bacteriol.* 114:752-766.
- STANLEY, D.W. (1991). Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Crit. Rev. Food Sci Nut.* 30: 487-553.
- STEWART, G.R., y MOORE, D. (1974). The activities of glutamate dehydrogenase during mycelial growth and sporophore development in *Coprinus lagopus* (*sensus* Lewis). *J. Gen. Microbiol.* 83: 73-81.

- SOKOLOVSKY, V.Y., LAUTER, F.R., MULLER-ROBER, B., RICCI, M., SCHMIDHAUSER, T.J., AND RUSSO, V.E.A. (1992). Nitrogen regulation of blue light-inducible genes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 138:2045-2049.
- SPIEGEL, S., HENIS, I., CHET, I., y MESSER, G. (1975). The effect of heat shock on differentiation of germinating conidia of *T. viride*. *Can. J. Botany.* 53: 2274-2281.
- STRINGER, M.A., y TIMBERLAKE, W.E. (1995). *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol. Microbiol.* 16:33-34.
- SUSSMAN, A.S., y DOUTHIT, H.A. (1973). Dormancy in microbial spores. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 311-352.
- SVIRCEV, A.M., JENG, R.S. y HUBBES, M. (1988). Detection of cerato-ulmin on aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi* by immunocytochemistry and scanning electron microscopy. *Phytopathology* 78: 322-327.
- TAKAI, S. y HIRATSUKA, Y. (1980). Accumulation of the material containing the toxin cerato-ulmin on the hyphal surface of *Ceratocystis ulmi*. *Can. J. Bot.* 58: 663-668.
- TALBOT, N.J. EBBOLE, D.J., HAMER, J.E. (1993). Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5:1575-1590.
- TAN, M.U.L., CHAN, M.K-H. y SADDLER, J.N. (1984). A modification of the Lowry method for detecting proteins in media containing lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Lett.* 6: (199-204.
- THEVELEIN, J.M. (1984). Regulation of trehalose mobilization in fungi *Microbiol. Rev.* 48:42-59.
- THEVELEIN, J.M. (1991). Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.* 5:1301-1307.

- TIMBERLAKE, W.E. (1990). Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu. Rev. Genet.* 24:5-36.
- TROSMO, A. (1991). Biological and integrated control of *Botrytis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control* 1: 59-62
- VAN ETEN, J.L., DAHLBERG, K.R. y RUSSO, G.M. (1983). Fungal spore germination. En: *Fungal differentiation. A contemporary synthesis.* J.E. Smith (ed). New York : Marcel Dekker Inc. Pags. 235-266.
- WOESTEN, H.A.B., DE VRIES, O.M.H., y WESSELS, J.G.H. (1993). Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell* 5:1567-1574.
- WOESTEN, H.A.B., ASESEGEIRSDOTTIR, S.A., KROOK, J.H., DRENTH, J.H.H y WESSELS, J.G.H. (1994). The fungal hydrophobin SC3 self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *Eur. J. Cell. Biol.* 63:122-129.
- WOESTEN, H.A.B., SCHUREN, F.J.H., y WESSELS, J.G.H. (1994b). Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* 13:5848-5854.
- WESSELS, J.G.H. (1994). Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:413-437.
- WESSELS, J.G.H., DE VRIES, O.M.H., ASESEGEIRSDOTTIR, S.A., y SCHUREN, F.H.J. (1991). Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* 3:793-799.
- WIENKEN, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek* 58:209-217.
- ZHANG, L., VILLALON, D., SUN, Y., KAZMIERCZAK, P. y VAN ALFEN, N.K. (1994). Virus-associated down-regulation of the gene encoding cryparin, an abundant cell surface protein from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Gene* 139:59-64.