

Santiago Gutiérrez Martín

Catedrático de Microbiología

LOS HONGOS FILAMENTOSOS: HISTORIA DE UN ÉXITO BIOTECNOLÓGICO

**Lección Inaugural del Curso Académico
2017-2018
Campus de Ponferrada**



**universidad
de león**

SANTIAGO GUTIÉRREZ MARTÍN
CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA

LOS HONGOS FILAMENTOSOS:
HISTORIA DE UN ÉXITO
BIOTECNOLÓGICO

SANTIAGO GUTIÉRREZ MARTÍN
CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA

LOS HONGOS FILAMENTOSOS:
HISTORIA DE UN ÉXITO
BIOTECNOLÓGICO

LECCIÓN INAUGURAL
CURSO ACADÉMICO
2017-2018
CAMPUS DE PONFERRADA



universidad
de león

■ Área de Publicaciones



© Universidad de León
Área de Publicaciones
© Santiago Gutiérrez Martín

ISBN: 978-84-9773-896-5
Depósito legal: LE-323-2017

Diseño y maquetación digitales: Juan Luis Hernansanz Rubio
Imprime: Gráficas CELARAYN
Impreso en España / *Printed in Spain*
León, 2017

Sr. Rector Magnífico
Sr. Vicerrector del Campus de Ponferrada
Autoridades
Miembros de la Comunidad Universitaria
Señoras y Señores

PRÓLOGO

Tengo el honor de haber sido designado como ponente de la lección inaugural del Curso académico 2017-2018, en el Campus de Ponferrada. Este es un hecho único en la carrera profesional de un Profesor Universitario, que se deriva de los muchos años de actividad docente e investigadora dedicados a esta Universidad y más concretamente al Campus de Ponferrada. El azar, la oportunidad, pero sobre todos esos muchos años de dedicación han hecho que haya sido propuesto para pronunciar esta lección, ocasión que aprovecharé también para exponer algunos de los logros alcanzados por nuestro grupo, no sólo en estos últimos veinte años, sino en la totalidad de mi actividad profesional.

En este momento hace 20 años que inicié mi labor como docente en el Campus de Ponferrada de la Universidad de León. Comenzaba el curso 1997-1998 como Profesor Asociado a “tiempo completo”, aunque previamente había sido Ayudante de Universidad, ejerciendo mi actividad en el Campus de Vegazana (León) desde el año 1992 y, con anterioridad, como becario, en todos los casos desempeñando mis funciones en el Área de Microbiología. Este curso académico que ahora comienza tiene especial significado en mi trayectoria profesional, ya que coincide con mi reciente promoción a Catedrático de Microbiología, por lo que me honra especialmente, no sólo por la impartición de la lección inaugural del curso académico, sino también por el momento en el que esta se produce.

Aprovecho esta oportunidad para agradecer a mis maestros, los Doctores Juan Francisco Martín, Enrique Monte Vázquez, Raymond J. Deshaies y Nancy J. Alexander el haberme transmitido sus conocimientos, pero sobre todo el haberme enseñado el camino para enfrentar los numerosos retos que se plantean a lo largo de una carrera

científica. No puedo olvidar tampoco a todos los estudiantes de doctorado y compañeros de laboratorio, de los que siempre he recibido más enseñanzas de las que yo les he proporcionado y que han sido parte fundamental de mi vida en estos años.

Finalmente a mi familia transmitirle mi cariño y agradecimiento, por poner las bases fundamentales que me han hecho lo que soy y que con la educación que me transmitieron también han hecho posible alcanzar este momento

Contenido	pág.
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Descripción de los hongos	11
1.1.1. La pared celular fúngica	12
1.1.2. La posición de los hongos en el conjunto de los seres vivos... 14	
1.1.2.1. Microorganismos eucariotas	16
1.1.3. Clasificación de los hongos	18
1.1.3.1. Clasificación filogenética de los hongos	22
2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS HONGOS	
FILAMENTOSOS	22
2.1. Producción de metabolitos secundarios por hongos	
filamentosos	27
2.1.1. Antibióticos β -lactámicos	29
2.1.1.1. La biotecnología en la producción de penicilinas y	
cefalosporinas	32
2.1.2. Péptidos no ribosomales	37
2.1.3. Poliquétidos	41
2.1.4. Terpenos	49
2.1.5. Alcaloides	61
2.2. Lucha Biológica	66
2.2.1. <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico	68
2.2.2. Interacciones <i>Trichoderma</i> -planta	72
2.2.2.1. Efecto de <i>Trichoderma</i> en la resistencia de las plantas	
a estreses abióticos	75

2.2.2.2. Otros efectos beneficiosos sobre las plantas del tratamiento con <i>Trichoderma</i>	76
2.2.2.3. Obtención de cepas modificadas de <i>Trichoderma</i> y efecto sobre su capacidad de biocontrol.....	77
2.2.2.4. Efecto de la expresión de genes de <i>Trichoderma</i> en plantas, sobre la respuesta de las plantas a condiciones de estrés	80
2.2.3. Utilización de <i>Trichoderma</i> en el mundo.....	83
2.3. Genomas Fúngicos.....	85
3. CONCLUSIÓN.....	89
4. BIBLIOGRAFÍA.....	91

1. INTRODUCCIÓN

El planteamiento de una lección inaugural de un curso académico siempre debe tener un sentido generalista, dado el carácter multidisciplinar de la audiencia, pero a su vez suficientemente atractivo para suscitar el interés de la misma, evitando aspectos excesivamente técnicos y especializados. Por ello planteo esta lección, en su parte inicial, de forma semejante a como lo haríamos en lecciones de inicio de curso de alumnos que cursan asignaturas de Microbiología por primera vez en sus carreras universitarias, como serían los alumnos de los actuales Grados en Biología, Biotecnología, Enfermería e Ingeniería Agroalimentaria, que son en las que he centrado mi labor docente de los últimos años. Para ello intentaré en un principio describir las características principales de los hongos filamentosos, su relación con el resto de los seres vivos, los distintos tipos de hongos existentes, su importancia en la naturaleza, así como sus aplicaciones en la industria biotecnológica, centrando la lección en los aspectos que han sido estudiados por los grupos de investigación en los que he estado implicado. Finalmente se analizará cual ha sido el impacto de las nuevas herramientas moleculares en el estudio de estos organismos.

1.1. Descripción de los hongos

Los miembros del Reino Fungi están presentes en prácticamente todos los nichos ecológicos. A pesar de su gran diversidad, la mayoría de los hongos comparten unas características celulares que son la base del éxito de su crecimiento, desarrollo, proliferación y supervivencia. Los hongos son organismos eucarióticos, es decir presentan compartimentalización de funciones fisiológicas en la célula (núcleo, mitocondrias, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, etc.) (**Fig. 1**), pero a diferencia del resto de eucariotas (células animales, plantas,

algas y protozoos) presentan una característica diferencial importante, que es la presencia de una pared celular con una organización y composición peculiares. Por otro lado, otra característica que presentan la mayoría de los hongos es la posibilidad de formación de estructuras filamentosas, denominadas hifas, que en su conjunto constituyen el micelio. Las hifas pueden ser cenocíticas, es decir sin separación física entre los núcleos, o tabicadas, en las que hay un septo que separaría las distintas células (= núcleos) (Fig. 1).

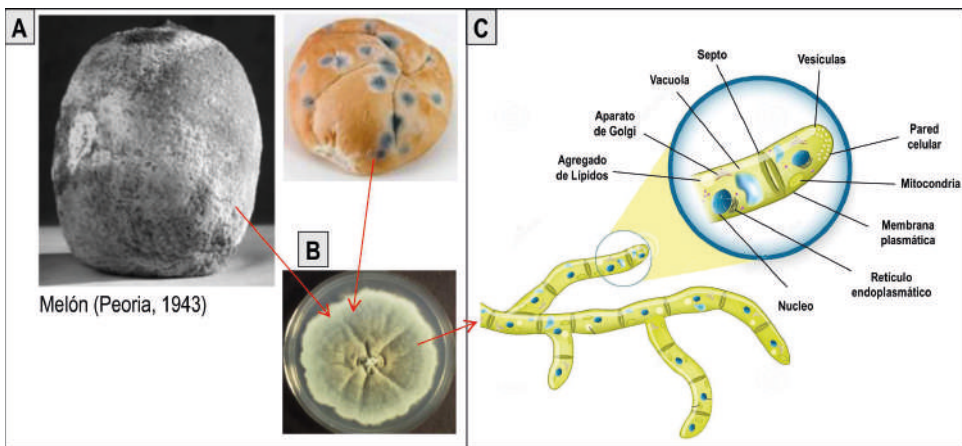


Fig. 1. A. Ejemplos de hongos filamentosos creciendo en la superficie de frutas y pan. B. Fotografía de una colonia de un hongo filamentoso. C. Esquema de una hifa fúngica tabicada, incluyendo los elementos más importantes de las células que la componen

1.1.1. La pared celular fúngica

Es una estructura que se encuentra en gran diversidad de organismos, con estilos de vida de crecimiento en condiciones ambientales con cambios continuos en la disponibilidad de agua. Debido a ello, la acumulación de grandes concentraciones de compuestos osmóticamente activos requiere de la presencia de una estructura que mantenga la integridad de las membranas celulares, y por tanto de la propia célula. Además, en el caso de los hongos, la capacidad de invadir muy diversos ambientes, sobre todo en el caso de los hongos filamentosos,

requiere la presencia de mecanismos eficaces de defensa frente a agresiones externas. La pared celular fúngica es un extraordinario ejemplo de un exoesqueleto protector. Adicionalmente, esta compleja estructura desempeña importantes funciones en la interacción con organismos del medio ambiente (animales, plantas y otros microorganismos).

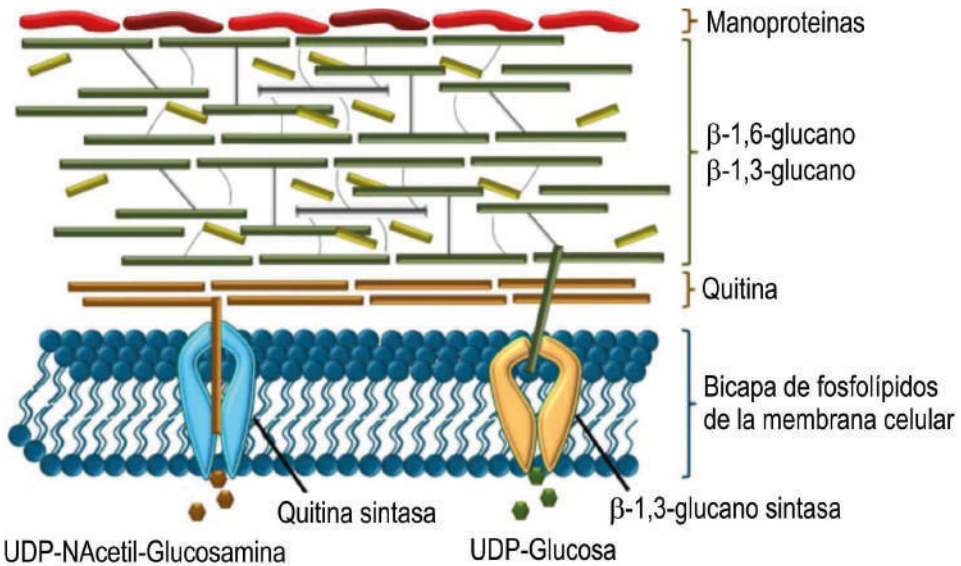


Fig. 2. Esquema general de la composición y estructura de la pared celular de los hongos (Fesel y Zuccaro, 2015). UDP, uridina difosfato.

La pared celular fúngica constituye aproximadamente el 25% del peso seco de la célula. Aproximadamente el 80% de la pared celular está formada por polisacáridos (Ruiz-Herrera 1992) (**Fig. 2**). El resto está compuesto por proteínas, lípidos, y diversas sales inorgánicas (**Fig. 2**). Los carbohidratos predominantes suelen ser glucanos y quitina. Estos azúcares, sintetizados principalmente en la región apical de la hifa en crecimiento, y posicionados de forma no uniforme, pero altamente regulada, proporcionan un esqueleto externo a las células fúngicas. Las proteínas presentes en la pared celular regularían la permeabilidad de la membrana a productos perniciosos y también de

proteínas presentes en el ambiente. Estas proteínas también están implicadas en el reconocimiento de otros hongos y en la regulación de procesos como la anastomosis (=uniones celulares), reconocimiento de células compatibles en el proceso de reproducción sexual, y en la interacción con diversos hospedadores (Lora et al., 1995; Saupe et al., 1996).

1.1.2. La posición de los hongos en el conjunto de los seres vivos

Desde el punto de vista formal, los hongos son microorganismos, y por tanto su estudio y clasificación se ha llevado a cabo de una forma paralela a la del resto de estos organismos. Inmediatamente después del descubrimiento de los microorganismos (S. XVII) se intentó ubicar a los microorganismos en uno de los dos Reinos clásicos: animal (*Animalia*) o vegetal (*Plantalia*), dependiendo de que poseyeran o no las características más fácilmente observables que distinguen a las plantas y a los animales. Así, los microorganismos que poseían tegumentos flexibles y eran en general móviles eran considerados como animales. Por el contrario, aquellos que poseían una pared celular rígida, fueran o no fotosintéticos, eran incluidos entre los vegetales.

Pronto se comprobó que este sistema no resultaba satisfactorio dada la gran variedad de formas descubiertas que presentaban características intermedias. Es por ello que en 1866 Haeckel propuso la creación de un tercer Reino: Reino *Protista*, en el que se incluirían todos aquellos organismos con una organización biológica simple -ya fueran unicelulares, cenocíticos o pluricelulares-. Sin embargo, el problema de la clasificación no quedó resuelto con la creación de este Reino, pues seguía alojando seres vivos muy distintos entre si, como los complejos protozoos unicelulares, las bacterias más sencillas, o los hongos pluricelulares pero relativamente sencillos. Por otro lado eran cada vez más evidentes las diferencias entre bacterias y algas verde-azuladas por un

lado, y el resto de protistas por otro.

El progreso en el conocimiento de la estructura y organización de los seres vivos condujo al notable descubrimiento de la existencia de dos patrones básicos de estructura celular en el mundo vivo, siendo entonces cuando Chatton (1937) estableció una filogenia universal al dividir a los organismos conocidos en dos grandes grupos según tuvieran o no membrana nuclear. Aparecieron así los términos *eucariota* para definir organismos con células nucleadas y *procariota*, para definir aquellas células que carecen de membrana nuclear, como es el caso de las bacterias y un grupo de algas verde-azuladas, las cianofíceas, que pese a ser fotosintéticas y debido precisamente a su estructura celular, pasarían a llamarse cianobacterias. De esta manera se procedió a dividir el Reino *Protista* en dos grupos: los protistas superiores, con una organización celular eucariótica (algas, hongos y protozoos), y los protistas inferiores, con organización celular procariótica (bacterias).

En 1956 Coopeland propone el sistema de los cuatro Reinos: Reino *Monera* formado por organismos sin núcleo (bacterias y cianobacterias); Reino *Protoctista*, que incluía individuos nucleados con poca o ninguna organización tisular (protozoos, algas rojas y pardas, y hongos); el reino *Metaphyta*, que incluía los individuos multicelulares con cloroplastos (algas verdes o clorofitas y plantas superiores); y finalmente el Reino *Metazoa*, compuesto por aquellos organismos pluricelulares que pasan en su desarrollo por estados de blástula y gástrula.

Años más tarde, R.H. Whittaker (1969) propone un nuevo sistema de clasificación de los seres vivos, basándose en los dos niveles de organización celular y haciendo énfasis en las tres formas principales de nutrición: fotosíntesis, absorción e ingestión. Surgen así los Reinos *Monera* (procariotas), *Protista* (eucariotas unicelulares con nutrición fotosintética o por ingestión), *Plantae* (eucariotas fotosintéticos),

Animalia (eucariotas fagotrofos) y *Fungi* (eucariotas osmotrofos). En esta nueva clasificación los microorganismos quedarían distribuidos en los Reinos *Monera* (bacterias y cianobacterias), *Protista* (protozoos y microalgas) y *Fungi* (hongos filamentosos y levaduras). A pesar de que la ordenación en cinco Reinos sigue siendo generalmente aceptada, en la 8ª edición (1974) del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” fue recogida la propuesta de Murray (1968) para la creación de un Reino *Procaryotae*. Dicho Reino, en el que quedarían incluidos los organismos agrupados en el Reino *Monera*, se subdividiría en dos grandes divisiones: la División I o *Cyanobacteria* y la División II o *Bacteria*.

1.1.2.1. *Microorganismos eucariotas*

La célula eucariota representa un estado de organización estructural y funcional más complejo que el procariota, reflejado en la existencia de una membrana nuclear que separa el material genético de un complejo citoplasma con orgánulos (entre ellos el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias o los cloroplastos), donde se compartimentalizan distintas funciones celulares. El genoma nuclear organizado en varios cromosomas, y los ribosomas de tipo 80S son, asimismo, propiedades distintivas. Aparte de otras muchas características, entre las que pueden citarse de manera resumida los constituyentes de la pared y las membranas celulares, los elementos del citoesqueleto o las histonas asociadas al ADN.

Dentro de este grupo se incluyen los hongos, algas y protozoos:

Los hongos son organismos heterótrofos osmotróficos, unicelulares, multicelulares o cenocíticos, carentes de clorofila y dotados de una pared rígida conteniendo gran diversidad de polímeros entre los que se pueden destacar la quitina. Muchos de ellos poseen organización filamentosa, estando el micelio constituido por hifas, tabicadas o no,

normalmente ramificadas, por las que fluye el contenido citoplásmico. Dentro de los hongos microscópicos se encuentran las levaduras, que son hongos unicelulares con un solo núcleo y que se dividen asexualmente por gemación o por fisión binaria. Las levaduras son microorganismos de gran interés por tratarse de modelos de estudio de las características de la célula eucariota. Muchos hongos, en especial algunos de los que causan patologías en los seres humanos y animales, son dimórficos, es decir, pueden cambiar de la forma de levadura a la forma de micelio en respuesta a diversos factores ambientales.

Las algas microscópicas también son objeto de estudio por la Microbiología. Constituyen un grupo muy heterogéneo de organismos fotosintéticos, que poseen cloroplastos y son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. Presentan una gran variedad morfológica, incluyendo estructuras multicelulares, similares a las de las plantas superiores. No obstante, la atención recibida por los microbiólogos ha sido más bien escasa porque no son agentes causales de enfermedades ni realizan fermentaciones. De hecho las algas microscópicas han sido frecuentemente tratadas como objeto material de estudio de la Botánica. Se trata, no obstante, de un grupo de interés creciente para los microbiólogos por su gran importancia ecológica y el número cada vez mayor de sus aplicaciones, como por ejemplo en el campo de la bioenergía.

Finalmente, **los protozoos** son un grupo de microorganismos unicelulares, no fotosintéticos, generalmente móviles, que se nutren por fagocitosis o por absorción de nutrientes. Están desprovistos de pared celular rígida, lo cual permite que puedan cambiar de forma y así moverse mediante la emisión de pseudópodos. En otros casos aún conservando su forma característica, poseen cilios o flagelos que hacen posible su locomoción en medio acuoso, que es su hábitat más

normal. Desde el punto de vista evolutivo, representan el estadio de mayor complejidad celular, pues en la célula-individuo se dan compartimentos que emulan la especificidad funcional de los tejidos de los metazoos. Sus características han hecho de estos organismos objeto de estudio también de la Zoología y de la Parasitología.

1.1.3. Clasificación de los hongos

Los hongos son microorganismos eucarióticos que presentan, a diferencia de las bacterias, ciclos de vida con mayor complejidad, fundamentada sobre todo en la posibilidad de presentar reproducción sexual y asexual (**Fig. 3**). La reproducción asexual consiste en una multiplicación mitótica, en la que todas las células descendientes, denominadas esporas asexuales, son genéticamente idénticas. A pesar de esta aparente simplicidad, en el caso de los hongos filamentosos, esta división mitótica se produce a partir de células especializadas de las hifas, dando en las diferentes especies a distintas formaciones a partir de las que se producirán las esporas asexuales (**Fig. 4**), incluso las diferentes estructuras en las que se producen dichas esporas reciben distintas denominaciones, al igual que las propias esporas producidas. Por tanto el tipo de reproducción asexual, o más bien el tipo de estructura que se forma en las distintas especies ha sido frecuentemente un criterio utilizado para clasificar los hongos.

No obstante, desde el punto de vista de la clasificación, se ha utilizado prioritariamente el tipo de reproducción sexual para establecer los distintos grupos, y por tanto para establecer el primer nivel de clasificación dentro de los hongos filamentosos. La reproducción sexual es un proceso por el que necesariamente se produce la fusión de células procedentes de hifas compatibles, pertenecientes a distintos signos de apareamiento (= "mating type") en el caso de los hongos filamentosos. Como resultado, al final del proceso se fusionarán los núcleos

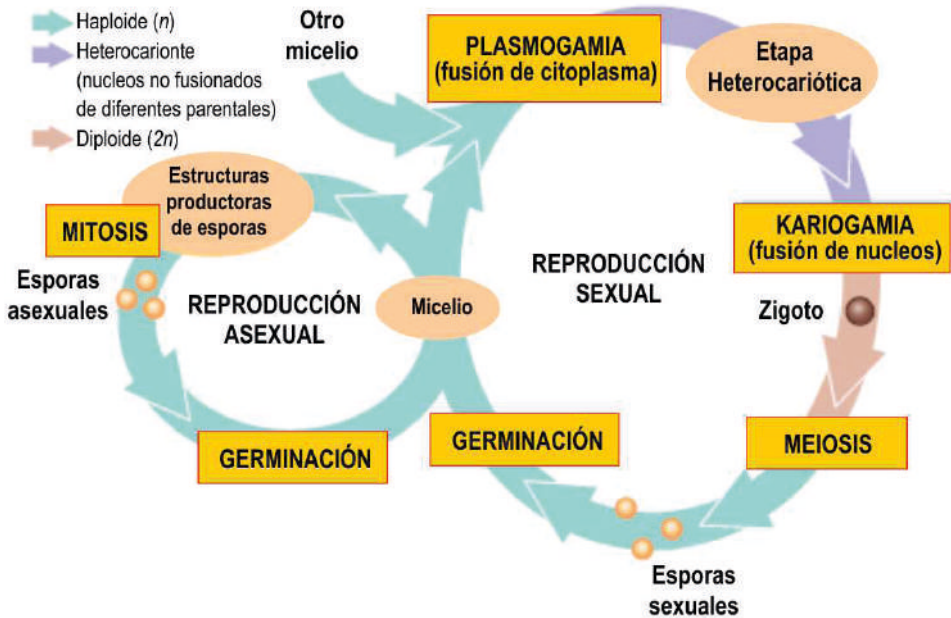


Fig. 3. Ciclos de reproducción asexual y sexual en hongos. Nótese que en las esporas asexuales se forman por un proceso de mitosis, mientras que en la reproducción sexual la formación de las esporas sexuales implica un proceso de meiosis.

de ambas células, formándose un cigoto que por tendrá doble carga genética ($2n$) que las células parentales (n). Este cigoto, en determinadas circunstancias, sufrirá un proceso de división meiótica que dará como resultado la formación de esporas sexuales. Las estructuras en las que se forman estas esporas sexuales permiten clasificar los hongos en cinco Phyla principales (**Fig. 5**):

Phylum Ascomycota: Micelio septado, o levaduriformes. Esporas sexuales: ascosporas, formadas internamente en una estructura denominada asca.

Phylum Basidiomycota: Micelio septado, o levaduriformes (ej. Género *Trichosporon*). Esporas sexuales: basidiosporas, formadas generalmente en el extremo de una estructura alargada denominada basidio.

Phylum Zigomycota: Micelio cenocítico, esporas asexuales: espo-

rangiosporas. Esporas sexuales: zigosporas, formadas en gran número en un esporangio de forma sacular.

Phylum Deuteromycota: Micelio septado o levaduriformes, reproducción sexual desconocida, incluso cuando alguna de las especies del mismo género se hayan ya clasificado en alguno de los Phyla anteriores.

Además de los cuatro Phyla anteriores, también se incluye el **Phylum Chytridiomycota**, que son los únicos miembros del Reino Fungi que producen zoosporas móviles con flagelos en número variable.

En décadas anteriores, además del tipo de reproducción, otras características fueron tenidas en cuenta para establecer las primeras clasificaciones. Así, la capacidad de crecer en diferentes medios de cultivo, temperatura de crecimiento, morfología de las colonias y de

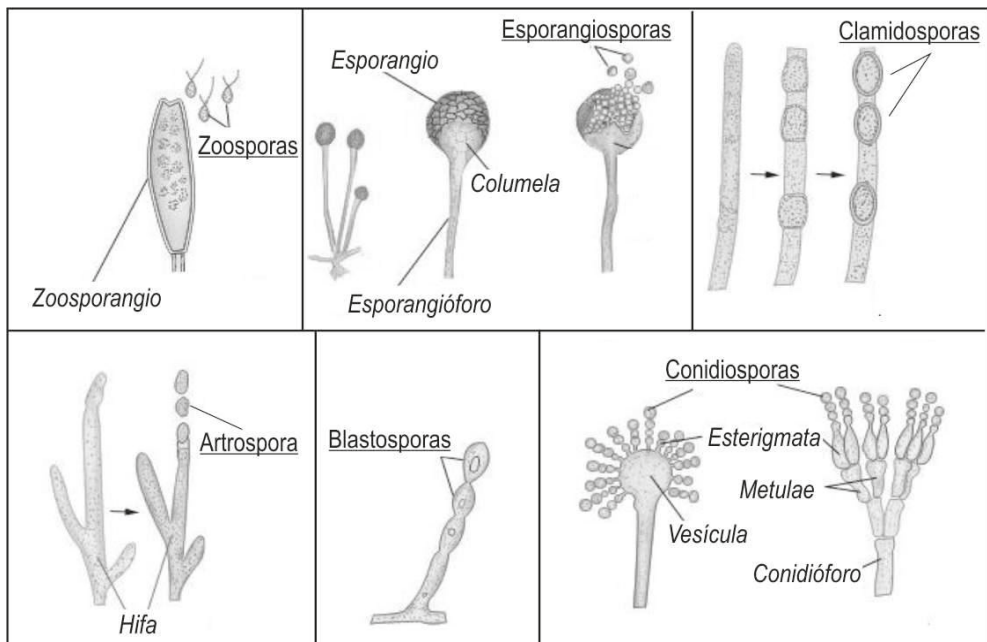


Fig. 4. Esquema mostrando las estructuras en las que se producen las esporas asexuales, así como las distintas denominaciones de las mismas.

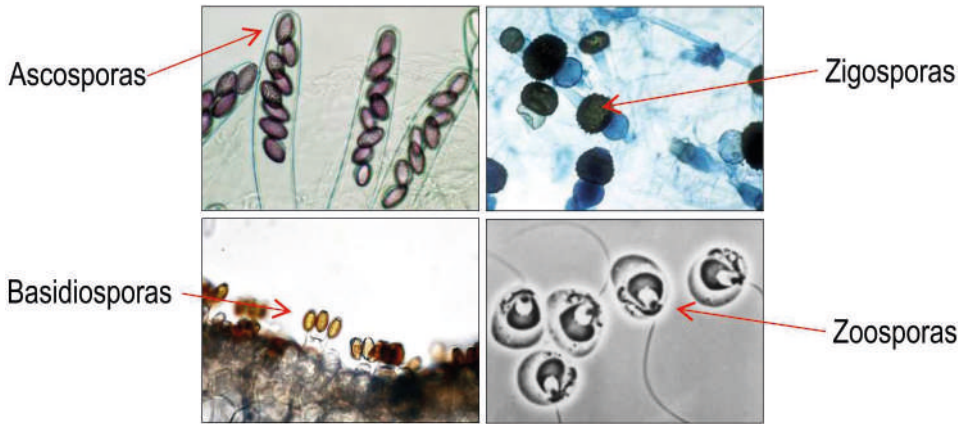


Fig. 5. Fotografías mostrando los tipos más comunes de esporas sexuales de hongos, así como las denominaciones de las mismas, que permite clasificar los hongos en los tres grupos principales: Ascomycetos, Basidiomicetos y Zigomicetos. Los Deuteromicetos no se incluyen pues este grupo está formado por aquellas especies de hongos en las que no se ha descubierto su reproducción sexual, aún cuando otras especies del mismo género sí la presenten. También se incluye una fotografía de las zoosporas producidas por hongos del Phylum Chytridiomycota.

las esporas, fueron características que junto con la morfología de los esporangióforos, cuando eran detectados, se utilizarían para diferenciar los distintos grupos. En la actualidad, con la aplicación de técnicas moleculares, mediante la secuenciación de regiones pertenecientes sobre todo al DNA ribosómico, y comparación con las bases de datos existentes, se consigue una identificación de forma más rápida y fiable. No obstante, para diferenciar cepas dentro de una misma especie, otros criterios pueden ser necesarios, aunque estos son muy variables dependiendo de los especímenes que se estén analizando. De manera, que como ejemplos representativos, se puede tener en cuenta el perfil de producción de metabolitos (metaboloma), o también estudiar diferencias en secuencias de genes conservados evolutivamente, diferentes al DNA ribosómico, como puede ser el caso de genes codificantes para factores de transcripción de genes del metabolismo primario.

1.1.3.1. Clasificación filogenética de los hongos

La disponibilidad de numerosos genomas de hongos en los últimos años, ha permitido mediante análisis filogenético de dichas secuencias, establecer una relación evolutiva a nivel molecular entre los distintos grupos. Uno de estos estudios indicaría que esta clasificación filogenética confirma la homogeneidad de los distintos Phyla establecidos en función del tipo de reproducción sexual. De este modo los Ascomycetos, Basidiomicetos y Zigomicetos se agrupan en clades (grupos) independientes entre sí, incluyéndose todos los Ascomycetos en los mismos clades, así como los Zigomicetos y Basidiomicetos, si bien en estos dos últimos Phyla el número de genomas analizados ha sido muy inferior (**Fig. 6**). Estos datos indicarían que el modo de reproducción de los hongos es un carácter consistente desde un punto de vista evolutivo. Por otro lado, como se puede observar también en la **Fig. 6** se pueden encontrar hongos patógenos para plantas y para el ser humano en todos los grupos analizados.

2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS

La biotecnología la podemos definir como el uso de procesos biológicos, organismos, o sistemas para obtener productos diseñados para mejorar la calidad de la vida del ser humano. Los primeros biotecnólogos fueron los campesinos que desarrollaron especies de plantas y animales mejorados por polinización cruzada y cruces de animales de especies próximas. En las últimas décadas la biotecnología se ha expandido en sofisticación, amplitud y aplicabilidad (“Convention on Biological Diversity, Article 2. Use of Terms, United Nations. 1992”).

La biotecnología se puede dividir en varias subdisciplinas denominadas roja, blanca, verde y azul. La biotecnología roja implica proce-

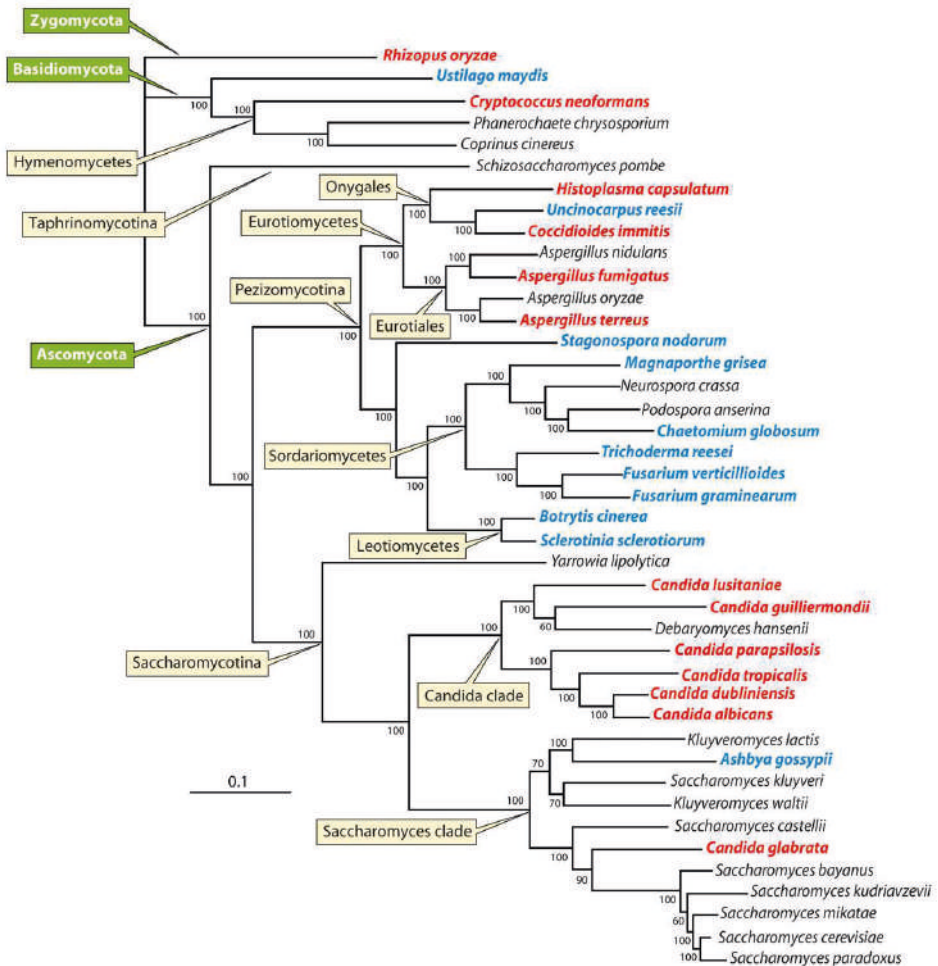


Fig. 6. Filogenia de máxima verosimilitud (“Maximum likelihood phylogeny”) reconstruida utilizando un alineamiento concatenado de 153 genes fúngicos universalmente distribuidos. El alineamiento concatenado contiene 42 genomas y exactamente 38000 posiciones aminoácidas (Butler, 2010; Fitzpatrick et al., 2006). En cada uno de los nodos se muestran los valores de “bootstrap”. Nota: No se ha incluido ningún genoma de hongos Chitridiomycetes.

Los médicos como la obtención de nuevos organismos para producir nuevos metabolitos con aplicación médica, o la generación de células madre para regenerar tejidos humanos o posiblemente para la generación de órganos completos. La biotecnología blanca (también llamada gris) implicaría procesos industriales como los que conducen a la obtención de nuevos productos químicos o el desarrollo de biocombus-

tibles para vehículos. La biotecnología verde se aplica a la agricultura e implica procesos como el desarrollo de cultivos resistentes a plagas o la obtención acelerada de animales resistentes a enfermedades, y la biotecnología azul, poco mencionada, acompasa procesos como el control de organismos nocivos en ambientes marinos y de agua dulce.

La biotecnología, como otras nuevas tecnologías, tiene un potencial de uso perverso. La preocupación por este riesgo ha llevado a realizar esfuerzos para establecer legislación restringiendo e incluso prohibiendo determinados procesos u organismos, como la clonación humana o la investigación con células madres embrionarias. También existe una gran preocupación porque los procesos biotecnológicos puedan ser usados con propósitos ilícitos, cuyo ejemplo más extremo podría ser su posible utilización en guerra biológica.

El inicio de la biotecnología microbiana se remonta a tiempos inmemoriales, hace 10-12 mil años el ser humano empezó a utilizar la agricultura, en lo que se puede considerar la principal revolución del Neolítico. Sin saberlo, los seres humanos de aquel tiempo estaban utilizando microorganismos en beneficio propio, en este caso microorganismos que asociados a las plantas incrementaban la producción de los cultivos, o incluso su protección frente a enfermedades, o la resistencia frente a condiciones adversas. Posteriormente, con el desarrollo de producciones como el pan y de bebidas fermentadas como el vino y la cerveza, o de alimentos como el queso y las muy diversas bebidas derivadas de la fermentación de la leche, cuyos orígenes en muchos de los casos también se remonta varios miles de años, se estaban utilizando microorganismos que llevaban a cabo dichas fermentaciones. Entre estos microorganismos, los hongos filamentosos y/o unicelulares han tenido un papel primordial.

No fue hasta el siglo XIX y ya bien entrado el siglo XX, con el desa-

rollo las distintas disciplinas y más concretamente de la microbiología, cuando se describieron al menos en sus fundamentos los procesos y organismos implicados en dichas producciones. En la actualidad son muchas las aplicaciones en las que los hongos son fundamentales (**Fig. 7**), pudiendo dividirlas en 7 grandes grupos que serían:

Fermentaciones alimentarias: fermentaciones llevadas a cabo por hongos filamentosos, en exclusiva, como sería el caso del pan, o formando parte de comunidades microbianas, para dar lugar a distintos productos alimentarios. Son fermentaciones utilizadas en todo el mundo, y cuyo valor económico es incalculable. Son por otro lado las primeras que de forma más o menos controlada fueron llevadas a cabo por el ser humano.

Biodegradaciones (no alimentarias): Se trata de degradaciones llevadas a cabo a partir de material biológico, y que contribuyen a incrementar su valor económico y/o nutricional.

Bioconversiones: Conversiones de productos, generalmente producidos por otros organismos, incluso procedentes de otros procesos de fermentación previos, para obtener derivados de mayor valor añadido, o con funciones biológicas diferentes.

Lucha biológica: Utilización de hongos filamentosos para la lucha frente a plagas de plantas, causadas por distinto tipo de agentes nocivos para los cultivos (nematodos, insectos u hongos).

Mejoras de las propiedades vegetales: hongos que en interacción con plantas mejoran su respuesta a las distintas condiciones ambientales (micorrizas).

Cultivo directo: Las setas que utilizamos como alimentos, y otros hongos que pueden utilizarse como aditivos alimentarios.

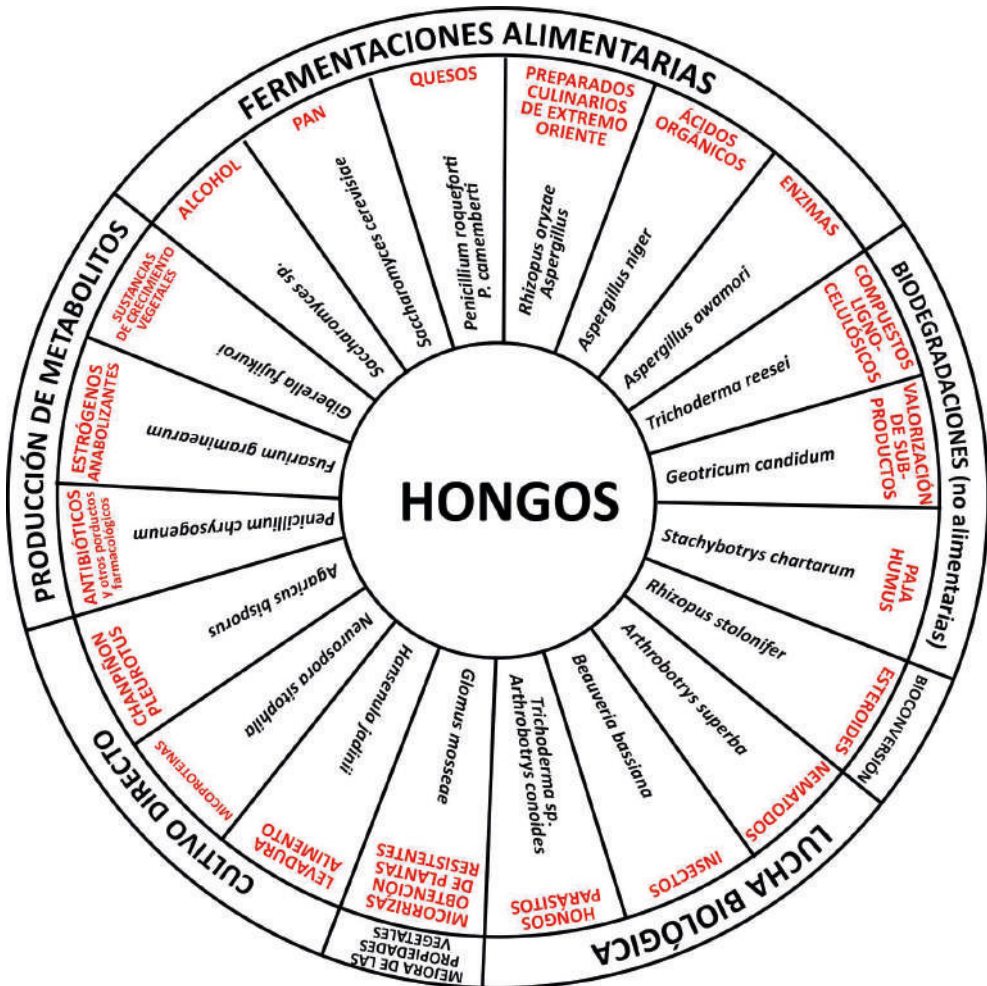


Fig. 7. Esquema resumen de las principales aplicaciones biotecnológicas de los hongos, así como algunos hongos ejemplo de las distintas aplicaciones.

Producción de metabolitos: Producción de compuestos con interés industrial a partir de hongos, en procesos de fermentación generalmente a gran escala. Normalmente estos compuestos tienen aplicación en farmacia (antibióticos, estrógenos), aunque también se pueden mencionar por ejemplo hormonas vegetales, y otros productos con interés en agricultura.

Evidentemente se incluyen en esta memoria sólo aquellas

aplicaciones que tienen repercusión por representar distintas actividades humanas o aplicaciones con interés industrial, con impacto significativo desde el punto de vista económico. No se incluye en esta lección el análisis de los hongos como agentes patógenos. Existen gran variedad de hongos patógenos tanto de plantas como de animales, incluyendo el ser humano (ver **Fig. 6**), que además producen distinto tipo de enfermedades, algunas de las cuales pueden incluso llegar a ser mortales. La importancia de los hongos como agentes causantes de enfermedades requeriría ser tratada en un capítulo específico con un enfoque diferente al que es objeto de la presente lección.

Como se puede observar el rango de aplicaciones de los hongos es muy amplio, y por tanto pretender abordar todas ellas en el marco de esta lección sería excesivo y pecaría de poco exhaustivo. Por tanto los apartados siguientes se van a centrar en aquellas aplicaciones que han sido estudiadas por los grupos de investigación en los que he estado integrado a lo largo de mi carrera. Por tanto se van a tratar las siguientes aplicaciones:

Producción de metabolitos.

Lucha biológica.

2.1. Producción de metabolitos secundarios por hongos filamentosos

Los metabolitos secundarios (SMs) son compuestos de bajo peso molecular que no son requeridos para el crecimiento y desarrollo, pero en su lugar proporcionan una ventaja ecológica bajo determinadas condiciones ambientales. Los SMs microbianos son muy diversos en cuanto a su estructura química y actividad biológica; algunos son toxinas, hormonas vegetales, pigmentos, o antibióticos, pudiendo muchos de ellos tener propiedades farmacológicas. Además, muchos SMs contribuyen a las interacciones hospedador-patógeno. Más allá

de su diversidad estructural, la mayoría de los SMs derivan de una de las cuatro clases de compuestos precursores: **péptidos no ribosomales, poliquétidos, terpenos, o derivados de dimetilaliltriptófano (DMATs)** (Hoffmeister and Keller 2007). La diversidad estructural de los SMs deriva de la variación funcional en las enzimas que sintetizan los compuestos precursores (péptido sintetasas no ribosomales, y poliquétido, terpeno y DMAT sintetasas), así como de las enzimas que catalizan la modificación de dichos compuestos precursores. Estas últimas incluyen acetiltransferasas, amino-transferasas, deshidrogenasas, reductasas, dioxigenasas y monooxigenasas. En hongos, los genes que codifican para enzimas requeridas para la síntesis de un mismo metabolito secundario están típicamente localizados adyacentes unos a los otros en un “cluster” (= agrupación de genes) de genes biosintéticos (Keller et al., 2005). Dichos cluster pueden también codificar para proteínas transportadoras que exportan los SMs de las células, factores de transcripción que regulan la expresión de los genes del cluster, y proteínas con otras actividades, muy variables de unos cluster a otros. Los SMs frecuentemente consisten en familias de compuestos análogos que comparten una estructura central (core), pero que pueden variar en presencia de determinados sustituyentes (grupos funcionales) unidos al core. La variación estructural entre los análogos de una familia de SMs es típicamente el resultado de la presencia, ausencia, o diferencias en función de los genes que codifican las enzimas modificadoras (Keller et al., 2005; Alexander et al., 2009; Proctor et al., 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior vamos a dividir los metabolitos secundarios producidos por hongos en 5 grupos derivados de las cuatro clases de compuestos mencionadas anteriormente:

1. Antibióticos β -lactámicos
2. Péptidos no ribosomales.

3. Poliquétidos

4. Terpenos

5. Alcaloides (derivados de DMAT)

2.1.1. Antibióticos β -lactámicos

Presentan un anillo β -lactámico (**Fig. 8**) y se dividen en cuatro grupos: penicilinas, cefalosporinas-cefamincinas, monobactamas y carbapenemas (**Fig. 8**).

De esos cuatro grupos sólo las penicilinas y cefalosporinas son producidas por hongos filamentosos. La síntesis de estos dos grupos de compuestos está ilustrada en la **Fig. 9**, y comienza con la condensación no-ribosomal de los tres aminoácidos precursores: L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina, esta condensación es llevada a cabo por una enzima que pertenece a la familia de las peptido sintetasas no ribosomales (NRPS), codificada por el gen *pcbAB*, para dar lugar al tripéptido L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV), en el que, a la vez que se ha sintetizado el tripéptido, se ha producido la epimerización de la L-valina a su isómero D. Posteriormente el tripéptido ACV es ciclado

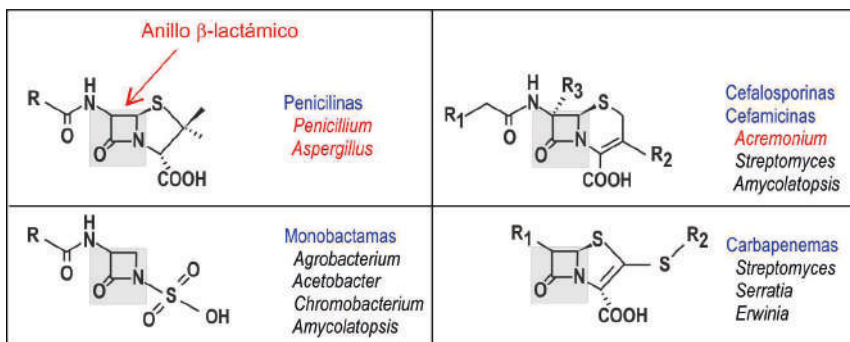


Fig. 8. Representación esquemática de la estructura de los cuatro grupos de antibióticos beta-lactámicos. Se indica con una flecha en la parte superior el anillo β -lactámico que da nombre a este grupo de compuestos. En azul se indican los cuatro grupos de beta lactamas y en cada uno de ellos los géneros más representativos de microorganismos productores. En rojo se indican los géneros de hongos filamentosos productores de penicilinas y cefalosporinas.

por la enzima Isopenicilina N sintasa o ciclasa, codificada por el gen *pcbC*, para dar lugar a la isopenicilina N, que es el primer intermediario de la ruta con actividad antibiótica (**Fig. 9**).

A partir de este intermediario las rutas de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas divergen. De manera que en la biosíntesis de penicilinas se produce la transferencia de la cadena lateral, activada como derivada de Coenzima A (CoA), mediante su intercambio por la cadena lateral de L- α -aminoadípico, para dar lugar, en el caso de que el precursor de la cadena lateral disponible en el medio fuera el fenilacetil-CoA, a la penicilina G. Esta última reacción sería catalizada por la enzima aciltransferasa, codificada por el gen *penDE* (Barredo et al., 1989). Posteriormente se descubriría que esta enzima además de la actividad descrita, tendría otras tres actividades más, todas ellas relacionadas con este paso de biosíntesis (Álvarez et al., 1993) (**Fig. 9**). Las penicilinas son producidas industrialmente por cepas derivadas de *Penicillium chrysogenum* (recientemente renombrada como *Penicillium rubens*) NRRL 1951, cepa que fue aislada en 1943 a partir de un melón contaminado obtenido en el mercado de frutas y verduras de Peoria (Illinois, USA) por investigadores del “Northern Regional Research Laboratory” (NRRL), dependiente del “United States Department of Agriculture” (USDA). No obstante, algunas especies del género *Aspergillus* también tienen capacidad de producir penicilinas, pero a un nivel muy inferior.

Por lo que se refiere a la síntesis de cefalosporinas, a partir de la isopenicilina N, se produce la isomerización de la cadena lateral de L- α -aminoadípico a su forma D-, obteniéndose de este modo penicilina N. En esta etapa intervienen al menos tres actividades enzimáticas, codificadas por los genes *cefD1*, *cefD2* que forman parte del cluster de genes tempranos de biosíntesis de cefalosporina C, y al menos una

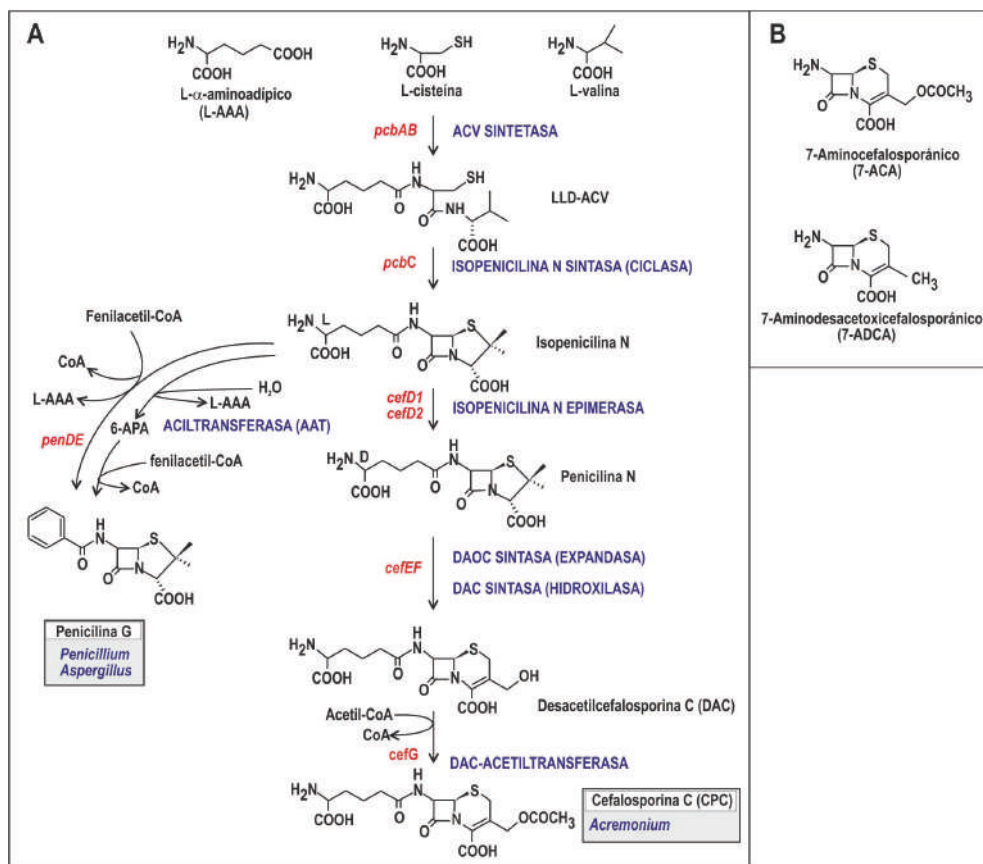


Fig. 9. A. Ruta biosintética de antibióticos β -lactámicos en hongos filamentosos. Los genes implicados se indican en itálica y color rojo, las enzimas en azul y letra mayúscula y los nombres de los distintos intermediarios en color negro. Finalmente los nombres científicos de los Géneros de hongos productores se indican en color azul e itálica junto con la estructura del compuesto final (penicilina G y cefalosporina C). **B.** Estructura de 7-ACA y 7-ADCA, obtenidos mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética (*ver apartado 2.1.1.1*).

actividad tioesterasa, todavía sin identificar (Ullan et al., 2002). Esta etapa en hongos filamentosos presenta diferencias muy importantes respecto a las bacterias productoras de cefamicinas, pues en estos últimos el paso de epimerización es llevado a cabo por una enzima que es codificada por un único gen, *cefD*. Posteriormente, el anillo tiazolidínico de cinco miembros, característico de las penicilinas, es expandido e hidroxilado, mediante dos actividades enzimáticas: desacetoxicefalosporina C sintasa (DAOC sintasa= expandasa) y la desacetilcefa-

losporina C sintasa (DAC sintasa= hidroxilasa), para dar lugar a la desacetilcefalosporina C (DAC). Estas dos actividades residen en un único péptido que es codificado por el gen *cefEF* (Samson et al., 1987). Nuevamente, en bacterias esta etapa biosintética presenta diferencias notables, ya que ambas actividades residen en dos péptidos diferentes, codificados por los genes *cefE* y *cefF*. La última etapa en la biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum* consiste en la acetilación de la DAC para dar lugar al antibiótico final, esta actividad es catalizada por la enzima DAC acetiltransferasa, que es codificada por el gen *cefG* (Gutiérrez et al., 1992) (**Fig. 9**).

Los antibióticos beta-lactámicos ejercen su acción inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, se trata de la familia más numerosa de compuestos antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica, y son considerados en conjunto como antimicrobianos de amplio espectro, afectando a un amplio rango de bacterias patógenas.

2.1.1.1. La biotecnología en la producción de penicilinas y cefalosporinas.

Probablemente la producción de penicilina sea uno de los ejemplos del impacto de las técnicas biotecnológicas en la producción de un metabolito de origen microbiano. Si bien la biotecnología se entiende como el conjunto de técnicas aplicadas para obtener el mayor beneficio de los sistemas biológicos, en el caso de la penicilina, se puede afirmar que el desarrollo biotecnológico inicial fue realizado por la propia evolución de las cepas que contenían los genes de biosíntesis. La historia de la penicilina comienza con la publicación de su descubrimiento por parte de Sir Alexander Fleming en 1929. La cepa productora descrita fue clasificada como *Penicillium notatum*, a partir de la que se realizaron los primeros estudios de este antibiótico, e incluso con la que

obtuvieron las primeras producciones a pequeña escala utilizadas en terapia humana, llevadas a cabo por el propio Fleming. No obstante, las cepas originales (NRRL 824, NRRL 1209) y algunos de sus derivados (NRRL 1249-B21) producían muy poca penicilina, y no fue hasta el año 1943 cuando se aisló la cepa *P. chrysogenum* NRRL 1951, a partir de un melón contaminado en el USDA (Peoria, Illinois) (**Fig. 1**). Esta cepa es la que se utilizó posteriormente para obtener todas las cepas de alta producción utilizadas actualmente en la industria, consiguiéndose incrementos en la producción, con los sucesivos programas de mejora, de más de 1000 veces. Estudios más recientes han permitido demostrar que *P. chrysogenum* presentaba una mutación puntual (C¹³⁵⁷-T) en el gen *pahA* que codifica para una citocromo P450 monooxigenasa, implicada en el catabolismo del fenilacético. Como resultado, las cepas de *P. chrysogenum* carecerían de dicha actividad y por tanto producían mayores niveles de penicilina, al no catabolizarse el fenilacetil-CoA, consiguiéndose de este modo niveles de producción cinco veces superiores a los de la cepa sin la mutación mencionada (cepa de *P. notatum* aislada por Fleming y derivadas) (Rodríguez-Sáiz et al., 2005).

Como se puede observar en la Figura 10, los procesos de mejora de las cepas productoras de penicilina se basaron, hasta los años sesenta en la selección de mutantes, los mutágenos usados más frecuentemente fueron rayos-X, mostazas nitrogenadas, y radiación ultravioleta de onda corta. No obstante, la mejora de cepas por mutación llegó a su límite en los años setenta. A partir de ese momento, con el descubrimiento del ciclo parasexual en *P. chrysogenum*, se obtuvieron cepas mejoradas mediante recombinación genética, aunque los mayores progresos se realizaron por la selección de segregantes haploides obtenidos mediante cruces de mutantes procedentes de diferentes cepas productoras.

En la década de los ochenta con la introducción de las técnicas de biología molecular se consiguió la caracterización genética de la ruta

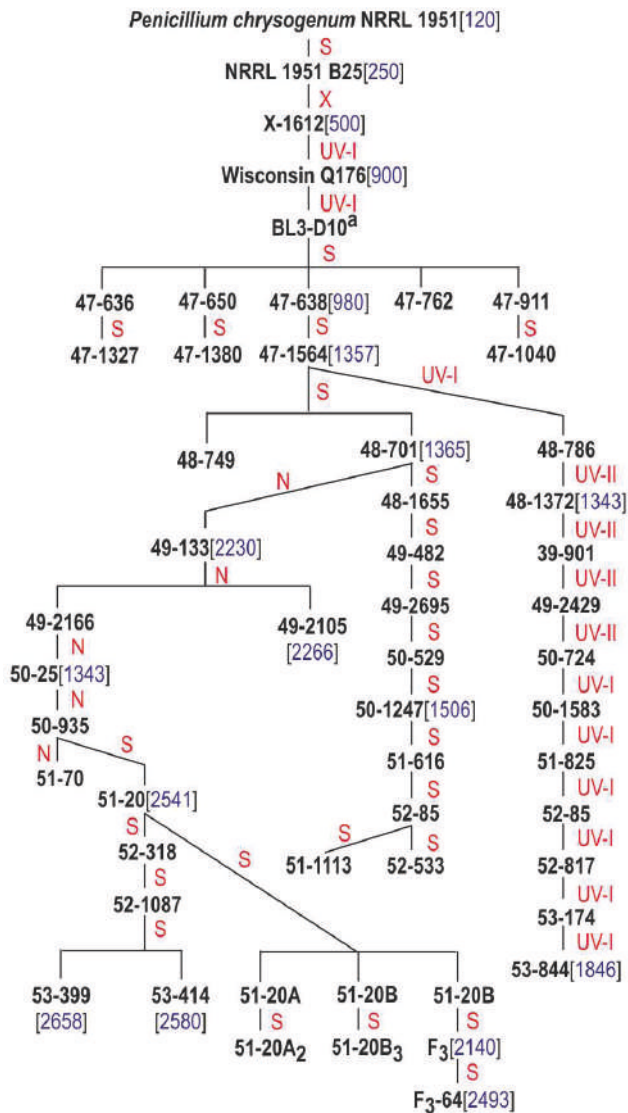


Fig. 10. Genealogía de las cepas productoras de penicilina de *Penicillium chrysogenum*. S.- etapas de selección de variantes naturales; X.- tratamiento con rayos X; UV-I.- radiación ultravioleta a 275 nm; UV-II.- radiación ultravioleta a 253 nm; N.- tratamiento con mostazas nitrogenadas [metil-bis-(β-cloroetil)amina]. Entre corchetes se muestran las producciones en unidades internacionales [unidades/ml]. a.- mutante no pigmentado. (Adaptado de Backus y Stauffer, 1955).

de biosíntesis y se consiguieron identificar otros genes y enzimas relacionadas con la producción de penicilina. Además de ello se concluyó la caracterización de las enzimas implicadas en dicha ruta. Se realizaron intentos también de incremento de producción mediante la manipulación genética de la ruta de biosíntesis, aunque como se demostraría en los años noventa los procesos de mutación al azar, así como las mutaciones naturales que portaban las cepas originales (Rodríguez-Sáiz et al., 2005), habían conseguido mejoras en la producción de penicilina, difícilmente igualables con la utilización de técnicas de biología molecular. De manera que como se puede observar en la **Fig. 11** el análisis de cepas de alta producción a escala pre- o industrial demostró que la región del genoma que contiene los genes de biosíntesis de penicilina se encuentra amplificada (Fierro et al., 1995), y dicha amplificación se había conseguido con los procesos de mutación-selección al azar utilizados en décadas anteriores.

La región que se encontraba amplificada en las distintas cepas de mediana o alta producción de penicilina tenía distinto tamaño, al igual que el número de copias de esa región amplificada en cada cepa. Curiosamente la región que se encontraba amplificada en la cepa E1 (57.9 kb) coincidía exactamente con la región que se encontraba delecionada en varios mutantes no productores de penicilina analizados (Ej. *npe10*). Además de ello, en los extremos de las copias de la región amplificada, así como en los extremos de la región delecionada en la cepa *npe10* se encontraba un hexanucleótido (TGTAAG o TTTACA), indicando que posiblemente esta secuencia sería un punto caliente "hot spot" de recombinación, lo que habría favorecido la generación de estas cepas de alta producción o no-productoras, como resultado de los procesos de selección y mutación a los que habían sido sometidos (Fierro et al., 1995).

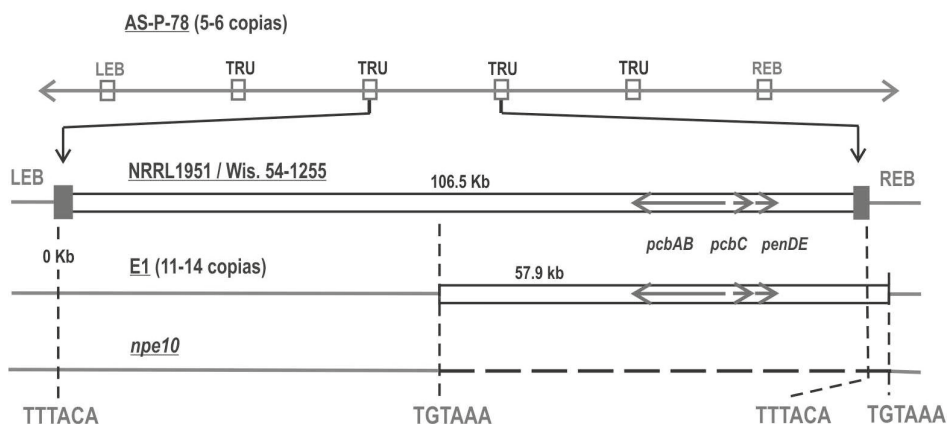


Fig. 11. Esquema de la región del genoma de *Penicillium* que contiene la agrupación (cluster) de genes estructurales de biosíntesis de penicilina (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*). También se muestra la región que se encuentra amplificada en distintas cepas productoras, cepa AS-P-78 (106.5 kb) y E1 (57.9 kb). Además, la región deletada en el mutante *npe10* se indica con línea discontinua horizontal. LEB, borde izquierdo de la región amplificada; REB, borde derecho de la región amplificada; TRU, secuencia de unión repetida de los tandem. Las secuencia de los hexanucleótidos conservados en estas tres regiones (LEB, REB y TRU) se muestra en la parte inferior (Fierro et al., 1995).

Por tanto, la mejora de la producción de estos antibióticos, y en general de la mayoría de los producidos industrialmente hoy día, se ha basado en innovaciones tecnológicas en los procesos de fermentación, y en programas de mejora de cepas por programas de mutación al azar de las cepas productoras y la selección posterior de los mutantes con mejor producción. Las técnicas de biología molecular han servido sobre todo para producir nuevos antibióticos. Por ejemplo la manipulación genética de *Acremonium chrysogenum* es un ejemplo en el que, mediante la utilización de estas técnicas, se han conseguido incrementos en los niveles de producción mediante el aumento del número de copias de los genes de biosíntesis, ya que en este hongo no se produce el fenómeno de amplificación de genes que se ha descrito en *P. chrysogenum*, y también mediante la mejora de la transferencia de oxígeno por expresión del gen que codifica para una hemoglobina (DeModena et al., 1993). Además, mediante el uso de estas técnicas se han con-

seguido cepas con nuevas capacidades biosintéticas, como la síntesis de 7-aminocefalosporánico (7-ACA) (Velasco et al., 2000) o de penicilina (Gutiérrez et al., 1991). De forma similar, en *Penicillium* se ha conseguido producir ácido adipoil-7-aminodesacetoxicefalosporánico (adipoil-7-ADCA) y adipoil-7-ACA (Crawford et al., 1995), que pueden ser transformados en 7-ADCA y 7-ACA (**Fig. 9**), compuestos que son económicamente relevantes. Asimismo, la expresión en *Escherichia coli* de genes que codifican para D-aminoácido oxidasas y cefalosporina acilasas, ha simplificado la bioconversión de cefalosporina C en 7-ACA, eliminando el uso de solventes orgánicos (Díez et al., 1997).

2.1.2. Péptidos no ribosomales

Constituyen una familia muy diversa de productos naturales, clasificados como metabolitos secundarios que presentan también gran variedad de propiedades como toxinas, sideróforos, pigmentos, antibióticos, compuestos citostáticos, inmunosupresores o agentes anticancerígenos, y que tienen en común que son sintetizados por un mecanismo independiente de los ribosomas. Los hongos filamentosos, al igual que la mayoría de los grupos de microorganismos son importantes productores de este grupo de compuestos. Estructuralmente estos péptidos también son muy diversos pudiendo ser lineales, ramificados, dímeros o multímeros, y macrocíclicos, o incluso macrociclos ramificados. En todos los casos su síntesis es llevada a cabo por enzimas denominadas péptido sintetetas no ribosomales (NRPS), las cuales están organizadas en módulos. Un módulo es una sección de la NRPS que incorpora de una forma específica un aminoácido en el péptido en crecimiento. Cada módulo se puede dividir en dominios, que catalizan, cada uno de ellos, una etapa de la síntesis del péptido. Cada módulo consiste básicamente de tres dominios, adenilación (A), dominio de unión a fosfopanteteina (= dominio transportador de pép-

tidos, =dominio de tiolación) (PCP= T), y dominio de condensación (C), los cuales actúan secuencialmente, al igual que los módulos, para dar lugar al péptido final (**Fig. 12**). Además de los dominios mencionados, algunos módulos pueden tener dominios adicionales, como por ejemplo, dominios de epimerización (E), metilación (M) o dominios tioesterasa (Te) (**Fig. 12, Fig. 13**).

El orden de los módulos normalmente es co-linear con la secuencia de aminoácidos del producto, y la síntesis ocurre en sentido N- a C-terminal, dando lugar a péptidos entre 3 y 15 aminoácidos.

El dominio A consiste en aproximadamente 550 aminoácidos, dentro de los cuales existiría una región de aproximadamente 10 aminoácidos que tendrían funciones semejantes a los codones del RNA mensajero en las enzimas NRPS, determinando la especificidad del sustrato, y por tanto el aminoácido que se unirá a ese dominio. Los aminoácidos que son reconocidos por los dominios -A- incluyen las formas D- y L- de los 20 que forman parte de las proteínas, así como algunos aminoácidos no-proteinogénicos, como hidroxiaácidos, por ejemplo los ácidos α -aminoadípico y β -butírico. Después de la activación del aminoácido en el dominio de adenilación -A-, el segundo paso es llevado a cabo por el dominio PCP/T de aproximadamente 80 aminoácidos, que une covalentemente el aminoácido activado a un brazo de 4'-fosfopanteteina mediante un enlace tioéster, y transfiere el sustrato activado al péptido en elongación, por la acción del dominio de condensación -C-. La última etapa es llevada a cabo por el dominio -C- de aproximadamente 450 aminoácidos, que cataliza la formación de enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo del péptido en crecimiento y el aminoácido llevado por el módulo adyacente, permitiendo la translocación de la cadena en crecimiento al módulo siguiente. Después del paso de condensación, el péptido intermediario lineal es

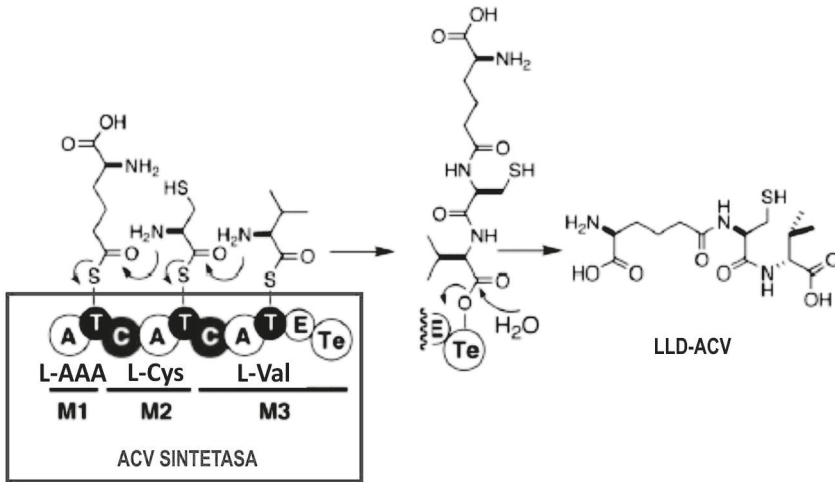


Fig. 12. Representación esquemática de una NRPS (Péptido sintetasa no ribosomal), la ACV sintetasa*, implicada en la síntesis de penicilinas y cefalosporinas (ver Fig. 9). La abreviatura de cada aminoácido indicada debajo de cada módulo (M1-M3) identifica el aminoácido activado por cada módulo. * la ACV sintetasa se considera como un modelo de NRPS (Adaptado de Felngle et al., 2008).

liberado por la acción del dominio tioesterasa (Te) por hidrólisis del péptido. El producto final puede ser modificado post-síntesis para conseguir su conformación final por enzimas adicionales que no formarían parte de la NRPS por N-, C- y O-metilación, glicosilación, hidroxilación, acilación, halogenación o formación de heterociclos. Estas enzimas adicionales contribuyen en gran medida al incremento en la diversidad de estructural de los péptidos no ribosomales.

Se han descrito diversos péptidos no-ribosomales (NRP) producidos por hongos filamentosos con interés desde el punto de vista aplicado, por ejemplo la gliotoxina producida por *Aspergillus fumigatus*, como una toxina importante en la virulencia de este hongo; ciclosporina, producida por *Tolypocladium inflatum*, utilizada como compuesto antiinflamatorio e inmunosupresor, y los peptaiboles, producidos por diversidad de hongos, pero que producidos por especies de *Trichoderma* podrían ser un elemento importante en la interacción con plantas, además de su actividad antifúngica. Esta lección se centrará en el aná-

lisis de los dos últimos grupos.

Ciclosporina: este NRP fue descrito en 1971, y su utilidad como fármaco inmunosupresor fue descubierta en 1973. Fue aislada a partir de *Tolypocladium inflatum* y actualmente es utilizado en trasplante de órganos, con el objetivo de evitar el rechazo del órgano trasplantado. Además también se utiliza en afecciones cutáneas (psoriasis, dermatitis atópica), reumáticas, así como en diversas afecciones intestinales, oculares y se ha investigado su utilización para reducir el daño en accidentes cerebrovasculares. Es sintetizada por una NRPS que sintetiza el undecapéptido. Esta enzima carece del dominio -Te-. De manera que el péptido es liberado por ciclación, y además algunos de los módulos contienen un dominio metiltransferasa adicional entre los dominios -A- y -P- (Felnalge et al., 2008, Keller et al., 2005) (**Fig. 13**).

Peptaiboles: con esta denominación se agrupan una familia de antibióticos peptídicos de origen fúngico. Son péptidos lineales que contienen entre 7 y 20 aminoácidos y que tienen como peculiaridad el contener una alta proporción de 2-amino-L-butírico (Aba), y frecuentemente un alquil-aminoácido en posición N-terminal. Se conocen al menos 317 estructuras de peptaiboles, agrupados en 9 sub-familias, y de ellos más de 190 son producidos por miembros de *Trichoderma* / *Hypocrea* (**Fig. 14**). La mayoría de estos compuestos tienen actividad antibiótica, que se debe a su capacidad de insertarse en la membrana del hongo diana y de formar poros en la misma. Esto es posible debido a la naturaleza anfipática de los peptaiboles. Adicionalmente inhibe la acción de enzimas asociadas a membrana implicadas en la síntesis de la pared celular. Se ha sugerido también la posible implicación de los peptaiboles en la actividad de biocontrol de algunas cepas de *Trichoderma*. De hecho se ha demostrado que los peptaiboles actúan de manera sinérgica con CDWEs (“cell wall-degrading enzymes”= en-

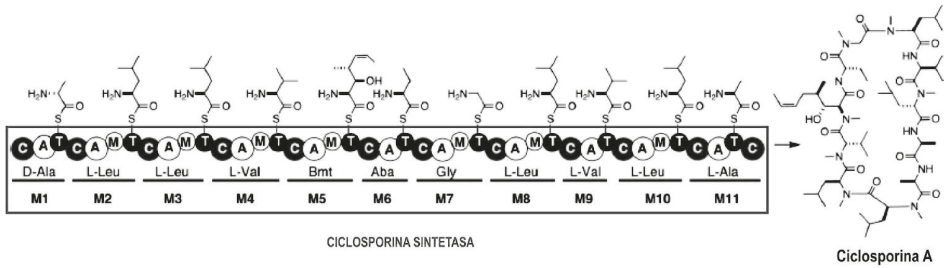


Fig. 13. Representación esquemática de la ciclosporina A y de la NRPS implicada en su biosíntesis, indicando los módulos (M1-M11) y dominios (C, A, T, M) que la componen. Bmt, (4*R*)-4-[(*E*)-2-butil]-4-metil-L-Thr; Aba, ácido 2-amino-L-butírico (adaptado de Felngle et al., 2008).

zimas degradadoras de pared) para inhibir el crecimiento de hongos patógenos (Shirmböck et al., 1994; Hermosa et al., 2014).

2.1.3. Poliquétidos

Son probablemente los metabolitos secundarios más diversos estructuralmente, incluyendo algunos con actividad antibiótica (aspino-lidas), toxinas (aflatoxinas). Son producidos tanto por eucariotas como por bacterias. Los poliquétidos (PKs) son sintetizados por una o más poliquétidos sintetas (PKS), que catalizan el ensamblaje de compues-tos naturales normalmente complejos a partir de precursores simples, como el propionil-CoA y el metilmalonil-CoA, en un proceso biosin-tético que presenta notables paralelismos con la síntesis de ácidos gra-sos. Al igual que los ácidos grasos, los PKs son ensamblados por su-cesivas condensaciones descaboxilativas de precursores simples. Sin embargo, los intermediarios en la síntesis de ácidos grasos se reducen totalmente (**Fig. 15**), mientras que los intermediarios en la síntesis de PK son sólo parcialmente procesados, dando lugar a un patrón com-plejo de grupos funcionales. Por otro lado, además del interés de los PK por sus propiedades antibióticas, anticancerígenas e inmunosu-presoras, estos compuestos también pueden facilitar la competición por los sustratos y la comunicación entre los organismos productores.

SUBFAMILIA 1 <u>18 residuos</u> cs Grupo 18 (G/A pos. 2) Grupo 19 (S pos 2) Grupo 21 (A pos 2) Grupo 22 (W,F pos 18) <u>19 residuos</u> <u>20 residuos</u> cs Alamethicin type (P pos 2) Paracelsin type (A pos 2)	AcUXXX(U,J)Q(J,U)XUXX UPLUUQ(L,I,V)ol AcUGUL U Q U UUAU UPLUUQV ol Trichotoxin, Trichovirins II AcUSAL U Q U VUGU UPLUUQV ol Hypomurocins, Trichokindins, Trichorzins MA AcUAUA UU Q U VUQ UPLUUQL ol Trichostromaticins AcUSAU J Q U VUGL UPLUUQW ol Trichorzins PA AcUAUULxQUUUSLxUPVxUVxQQLxol Trichostrigocin A AcUGFUU QUUUSLxUPVxUVxQQLxol Tricholongin II AcU(P,A)UAU(A,U)QU(V,L)UG(L,U)UPVUU(G,Q)QFol AcUP UAUA QUV UGL UPVUUG QFol Alamethicin AcUA UAUA QUL UGU UPVUUQ QFol Paracelsin B
SUBFAMILIA 4 <u>11 residuos</u> cs <u>14 residuos</u> cs	AcUN(Vx,Lx)(V,Lx)UPLxLxUPX ol AcUNV V UPL L UPV ol Trichovirins Ac(U,J,Vx)(N,Q)(Vx,Lx)UP(A,S,Vx,Lx)(Lx,Vx)UP(U,Vx,Lx)(Vx,Lx)UP(Vx,Lx)ol AcU (N,Q)L UP(A,S) (V,I) UP(J,U) L UP(L,V) ol Harzianins Ac(U,J) (N,Q)L UP(A,S) V UP(J,U) L UPL ol Trichovirins
SUBFAMILIA 5 <u>7 residuos</u> <u>10 residuos</u> <u>11 residuos</u>	(lipopeptaiholes) Oc VxG LxUGLxLxol Trichodecenins OcUGVxU VxLxUGLxLxol Lipopubescins OcUGVxUGGVxUGLxLxol Lipostrigocins
SUBFAMILIA 9	(aminolipopeptidos) Trichopolyns

Fig. 14. Representación esquemática de peptaiboles conocidos producidos por *Trichoderma*, pertenecientes a las subfamilias 1, 4, 5 y 9. Las secuencias de los peptaiboles se indican en código de una letra (Ac= acetil-, U=Aba= 2-amino-L-butírico, J=Iva, Vx=Val/Iva, Lx=Leu/Ile, ol representa el amino alcohol terminal). Las letras en negrita indican aquellos residuos conservados dentro de cada grupo. Secuencia consenso= cs (Imagen tomada de Hermosa et al., 2014).

Las PKS en general y concretamente las PKS fúngicas tienen una estructura modular, existiendo distinto tipo de PKS en función de la organización y funcionamiento de los dominios que la componen. De este modo las PKS tipo I, presentan distintos dominios en un mismo polipéptido, que pueden ser utilizados más de una vez en la biosíntesis (interactivas), o aquellas que incorporan un set o módulo de dominios enzimáticos para cada ciclo (modulares) (**Fig. 16**); las PKS de tipo II, son complejos interactivos de proteínas discretas, cada una de las cuales tiene funciones específicas en la ruta, la iniciación de la cadena y la elongación con malonato son llevados a cabo por lo que se denomina PKS mínima, que consiste de dos enzimas KS (KSa y KSb), y una ACP,

posteriormente intervendrán subunidades adicionales para dirigir el plegamiento de la cadena poliquetídica y otras enzimas, oxigenasas, glicosil-, N-, O- y C- metiltransferasas llevarán a cabo las modificaciones finales (ej. PKS tipo II implicada en la síntesis de macrotetrolida en *Streptomyces griseus*, Liu et al., 2002); y las PKS tipo III utilizan un solo sitio KS para catalizar la condensación repetitiva de unidades de acetato a la molécula iniciadora activada como CoA, produciendo compuestos aromáticos mono- y bi-cíclicos, la extensión de la cade-

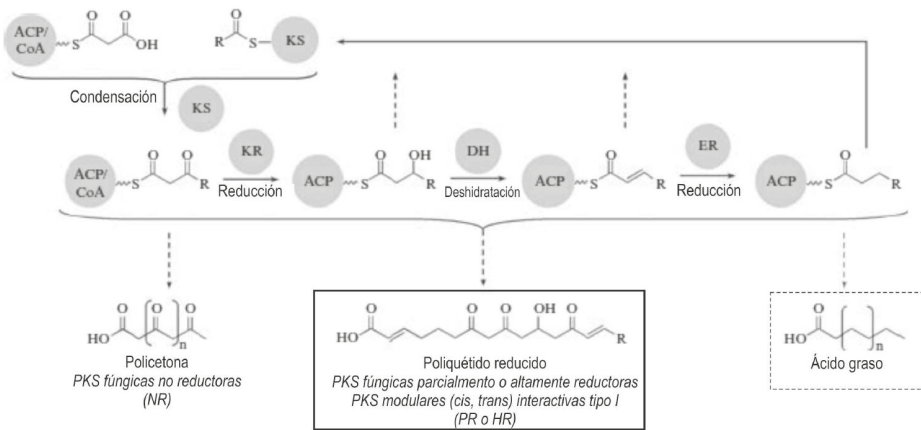


Fig. 15. Esquema de una reacción genérica de biosíntesis de ácidos grasos y poliquétidos, indicando como la reacción básica de síntesis de ácidos grasos puede derivar para generar diversidad de estructuras poliquetídicas, incorporando diferentes niveles de reducción. Los poliquétidos más comunes en hongos se han recuadrado. Los ácidos grasos se han recuadrado con línea discontinua. ACP, dominio acil-carrier;; KS, cetosintasa; KR, dominio ceto-reductasa; DH, dominio deshidratasa; ER, dominio enoil-reductasa; NR, PKS fúngicas no-reductoras; PR o HR, PKS fúngicas parcialmente o altamente (highly)-reductoras, respectivamente (adaptado de Weissman 2009).

na es frecuentemente seguida por una condensación y aromatización intramolecular del intermediario lineal en el sitio activo de la PKS, además pueden participar diversidad de enzimas posteriormente que serán responsables de la gran variedad de compuestos producidos, al igual que la unidad iniciadora utilizada y el número de pasos de elongación (ej. enzima DpgA de *Amycolatopsis orientalis*, implicada en

la síntesis de 3,5-dihydroxyphenylglycina (dpg) en *Streptomyces griseus*, Yu et al., 2012).

Los hongos filamentosos producen gran variedad de compuestos poliquetídicos, de los que en esta lección vamos a centrar la atención en cinco de ellos: Lovastatina, fuminosinas, aspinolidas, pironas y aza-filonas. En su biosíntesis participa al menos una PKS tipo I interactiva, excepto en el caso de las pironas, cuya biosíntesis todavía no ha sido descrita.

Lovastatina: Su biosíntesis se describió en *Aspergillus terreus*, y en ella participan dos PKS tipo I y una enoil-reductasa adicional (**Fig. 17**). La lovastatina es un inhibidor de la hidroximetil-glutaril-CoA reductasa (HMGR), una enzima implicada en la síntesis del colesterol. Por tanto su aplicación se centra en el tratamiento de la hipercolesterolemia, para reducir la prevalencia de Alzheimer y enfermedad renal progresiva, también como antiinflamatorio e inmunomodulador, e incluso para mejorar la regeneración ósea. No obstante, se han descrito efectos secundarios adversos a nivel hepático y también reacciones alérgicas severas (Goswami et al., 2013).

Fuminosinas: Son compuestos que aparecen frecuentemente como contaminantes en maíz. Son tóxicos tanto para plantas como para to-

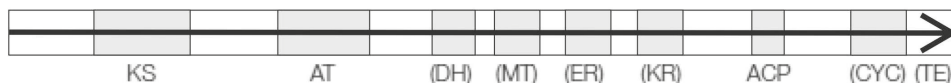


Fig. 16. Estructura modular de una poliquetido sintasa (PKS) fúngica. La estructura mínima es KS-AT-ACP. Los dominios opcionales se muestran entre paréntesis. La síntesis del poliquetido se inicia cuando acetil y malonil coenzima A (CoA) se unen como tioésteres en el dominio acil-carrier (ACP) por la acción del dominio aciltransferasa (AT). Posteriormente se produce la condensación con otro tioéster intermediario unido al dominio cetoacil-CoA sintasa (KS), produciéndose entonces la descarboxilación del intermediario unido al dominio ACP. El β -cetotioéster resultante puede ser reducido por la acción del dominio ceto-reductasa (KS), seguido por la deshidratación por el dominio deshidratasa (DH). Además si está presente un dominio enoil-reductasa (ER), se formaría un intermediario insaturado. Algunas PKS contienen un dominio metiltransferasa (MT) que metila el carbono alfa del tioéster. CYC, ciclasa; TE, tioesterasa (adaptado de Keller et al., 2005).

dos los modelos animales estudiados, incluido el hombre, presentando actividades hepato- y nefro-tóxica. Su producción se ha demostrado en al menos ocho especies del género *Fusarium*, incluyendo dos de los más comunes patógenos de maíz (*F. proliferatum* y *F. verticilloides*), aunque estos compuestos no serían responsables primarios de los síntomas observados en maíz contaminado con estos hongos. Las fumonisinas de la serie B son las más comunes en maíz contaminado, así como en cultivos de los hongos mencionados (**Fig. 18**).

Aspinolidas: Compuestos poliquetídicos inicialmente descubiertos en *Aspergillus ochraceus*, y posteriormente en *Trichoderma arundinaceum*, en el que se describieron las 6 aspinolidas conocidas hasta el momento (AspB, C, D, E, F, G) (**Fig. 19**). Se ha demostrado que la AspC tiene actividad antifúngica y fitotóxica. Su efecto sobre animales y seres humanos no se ha descrito hasta el momento. La AspC tiene también capacidad de inducir la expresión de genes de defensa en plantas (Malmierca et al., 2015). Mediante estudios de genómica comparativa se ha identificado la región del genoma de ambos hongos que contiene el cluster de genes de biosíntesis de estos compuestos. En estos cluster hay dos genes *PKS*, de los que uno de ellos, denominado *ASP1*, se ha demostrado que es esencial en la biosíntesis de las aspinolidas. Como se puede observar en la **Fig. 20** existe un elevado grado de sintenia en los genes de los cluster de los dos hongos.

Pironas: La 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP) (**Fig. 21**) fue el primer compuesto volátil aislado de especies de *Trichoderma*. Son producidos por muchas cepas de *Trichoderma* y pueden ser reconocidos por un marcado aroma a coco. Las 6-PP han demostrado tener una potente actividad inhibidora frente a un amplio rango de hongos y oomicetos patógenos de plantas (Claydon et al., 1987; Rubio et al., 2009). La fuerte relación entre la producción de 6-PP por *T. harzianum* y su capacidad

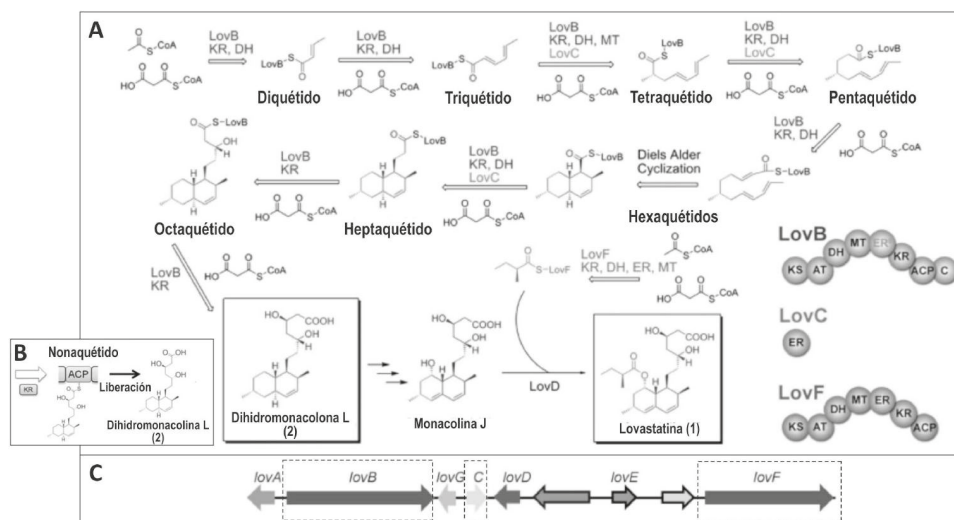


Fig. 17. A. Ruta de biosíntesis de la lovastatina (1). Se muestra en la parte derecha inferior la estructura de módulos de las PKS LovB y LovF, además de la enoil-reductasa (ER) accesoria que actúa en interacción con LovB. LovB consiste de ocho dominios discretos y actúan interactivamente para condensar nueve unidades de malonil-CoA para producir el nonaquétido dihidromonacolina L (2). La acción de LovB sobre el malonil-CoA se inicia con un proceso de descarboxilación para producir la unidad iniciadora de acetato. Cada ronda de condensación de Claisen es catalizada por el dominio KS, mientras que el PK en crecimiento es unido al brazo de fosfopanteteína del ACP. Después de cada condensación (dominio C), el PK es sometido a una serie de modificaciones, que pueden incluir α -metilación por el dominio MT, β -ceto-reducción por el dominio KR, β -deshidratación por el dominio DH, y α - β -enoilreducción por la proteína LovC. **B.** Después de la formación del nonaquétido, este es liberado. **C.** Esquema del cluster de genes implicados en la síntesis de lovastatina, se muestran en recuadros con línea discontinua los tres genes estructurales de biosíntesis. (adaptado de Ma et al., 2009; Fisch 2013; Ames et al., 2012).

para suprimir el crecimiento de los hongos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y *Rhizoctonia* es bien conocida (Ghisalberti et al., 1990). Sin embargo, las 6-PP tienen un efecto muy útil pero transitorio y puede no persistir en el ambiente (Hanson, 2005). De manera que un papel de regulación de estas moléculas puede ser difícil de demostrar. Se ha constatado que mutantes de *T. atroviride* con una producción reducida de 6-PP ejercen un fuerte efecto antagonista frente a *R. solani* (Reithner et al., 2005) y esto sugiere que las 6-PP podrían tener más funciones que la mera actividad antibiótica. Se ha sugerido también que las 6-PP podrían actuar como estimuladores del crecimiento vegetal a bajas do-

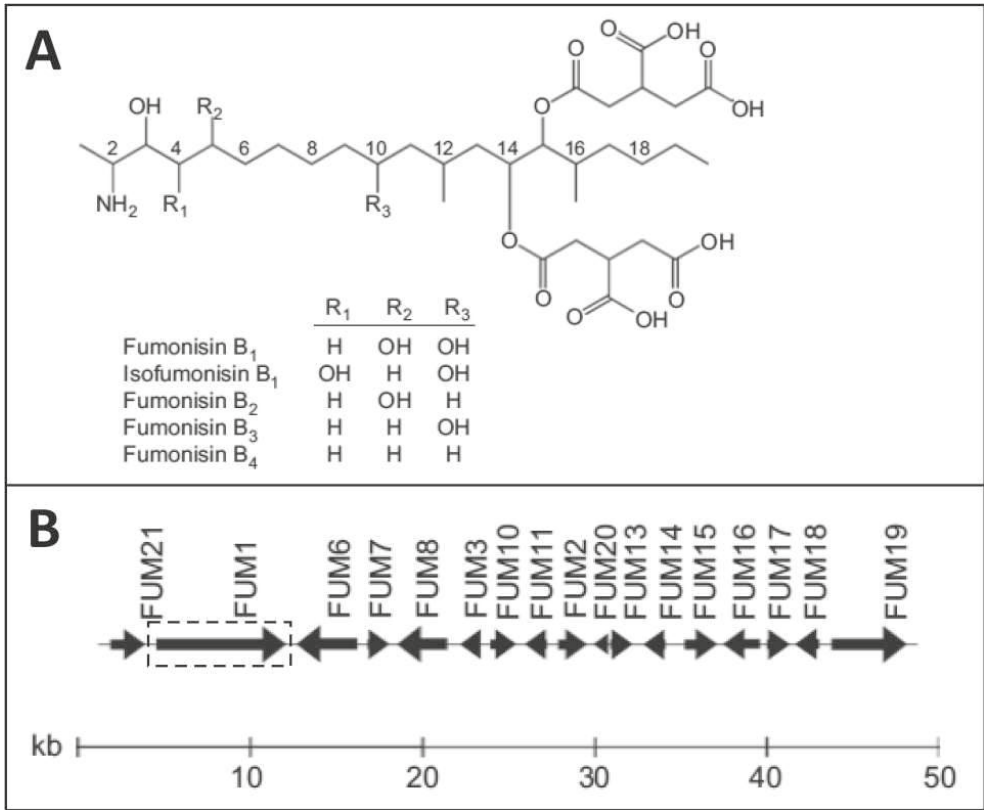


Fig. 18. A. Estructura de fumonisinas de la serie B. **B.** Cluster de genes de biosíntesis de fumonisin en *F. verticillioides*. Las flechas indican la posición y la orientación transcripcional de los genes. El orden y la posición de los genes en otras especies de *Fusarium* es similar. Se indica recuadrado con línea discontinua el gen *FUM1* que codifica para la PKS implicada en la biosíntesis (adaptado de Alexander et al., 2009).

sis pero que podrían tener efectos inhibidores a mayores concentraciones, y/o que podrían estar implicados en la producción de inductores de auxinas (Vinale et al., 2008). Recientemente se ha demostrado que la 6-PP producida por *T. atroviride* regula el crecimiento de raíz en *Arabidopsis thaliana* mediado por la señalización de auxinas (Garnica et al., 2016). En *T. atroviride* también se ha descrito una relación entre 6-PP y la regulación de sesquiterpenos en mutantes interrumpidos en la proteína G heterotrimérica (Reithner et al., 2005) y un incremento del nivel de 6-PP en mutantes interrumpidos en la MAPK1 (Reithner

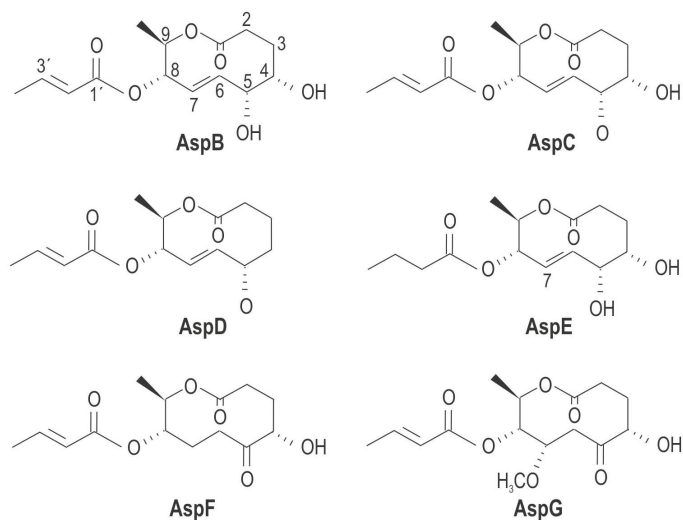


Fig. 19. Estructura de las aspinolidas producidas por *Trichoderma arundinaceum* (tomado de Malmierca et al., 2015).

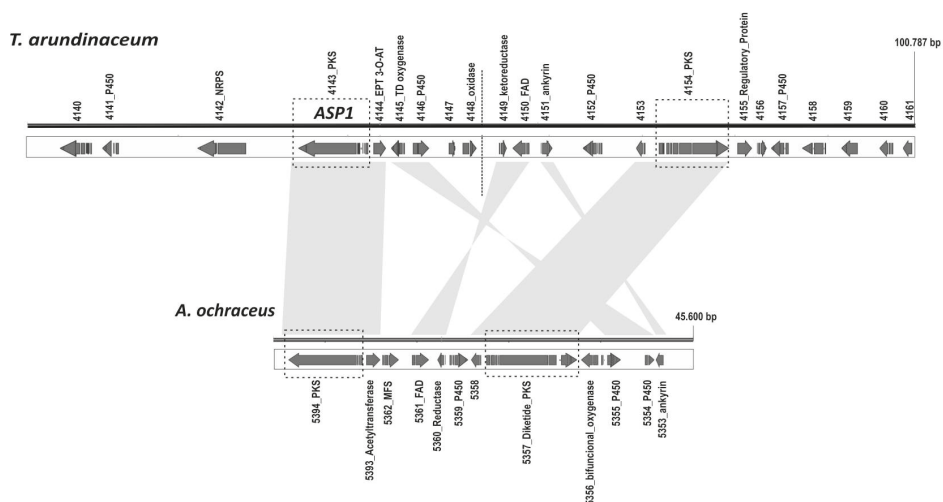


Fig. 20. Cluster de genes de biosíntesis de aspinolidas en *T. arundinaceum* y *A. ochraceus*. Las flechas indican la posición y la orientación transcripcional de los genes. Las discontinuidades dentro de cada flecha indican los intrones. Las zonas grises entre ambos cluster indican el nivel de sintenia mantenido en los distintos genes en ambas especies. Los dos genes *PKS* de los dos cluster se encuentran recuadrados con línea discontinua (resultados no publicados).

et al., 2007). Finalmente las pironas son poliquétidos, para cuya biosíntesis se requerirá al menos una poliquétido sintasa (PKS).

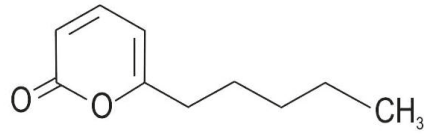


Fig. 21. Estructura de 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP)

Azafilonas: Son pigmentos amarillos, naranjas y rojos producidos por especies del género *Monascus* (**Fig. 22**), en cuya biosíntesis interviene una PKS no reductora del tipo I. Estos pigmentos son muy solubles en agua y etanol y en Europa se utilizan para sustituir parcialmente a nitratos y nitritos como conservantes y potenciadores del color en productos cárnicos, incluyendo salchichas, patés y otros embutidos (Chen et al., 2017).

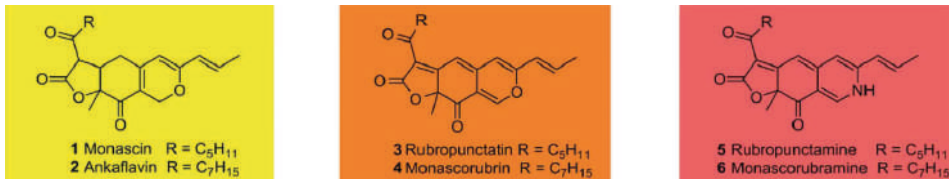


Fig. 22. Principales pigmentos del grupo de la azafilonas producidos por especies del género *Monascus*. El color de cada caja ilustra el color de los pigmentos, amarillo, naranja y rojo, incluidos en la misma.

2.1.4. Terpenos

Constituyen una de las familias más grandes de productos naturales, incluyendo numerosos metabolitos secundarios con importantes actividades farmacológicas como antivirales, antibacterianas, antimalaria, y antiinflamatorias, inhibición de la síntesis de colesterol, y actividad anticancerígena. Estos compuestos también están implicados en el proceso de biocontrol en especies del género *Trichoderma*, por ejemplo, debido a sus actividades antifúngicas (ej. ergokoninas y viridinas) pero, adicionalmente, su función estructural en las membranas celulares (ej. ergosterol) es esencial. Los hongos filamentosos produ-

cen gran variedad de estos compuestos.

Por otro lado, los terpenos también median en interacciones antagonistas y beneficiosas entre organismos (Gershenzon y Dudareva, 2007). Sin embargo, como muchos productos naturales, los terpenos son producidos normalmente en pequeñas cantidades y como mezclas complejas por plantas y microorganismos. En plantas, los terpenos confieren termoprotección, tolerancia a especies reactivas de oxígeno (ROS) y aceleración de florecimiento (Sharkey et al., 2008). Sin embargo, pueden actuar como inductores de hormonas vegetales implicadas en crecimiento y regulación del desarrollo, como es el caso del ácido abscísico (ABA) (González-Guzmán et al., 2002). Aunque el conocimiento de las funciones del ABA en respuesta a patógenos es todavía muy fragmentario, esta hormona puede jugar un papel ambivalente en esta defensa (Asselbergh et al., 2008). Se ha sugerido que la emisión de terpenos puede disipar el exceso de energía cuando las hojas reciben más luz de la que pueden usar (Magel et al., 2007). En cualquier caso, las funciones primarias de los terpenos, como otros compuestos volátiles, son defender plantas frente a herbívoros y patógenos, atraer polinizadores, dispersadores de semillas y otros animales beneficiosos (incluyendo enemigos naturales de los herbívoros), y microorganismos, y servir como señales para la comunicación intra- e inter- planta (Heil y Silva-Bueno, 2007). Se ha descrito que los genes implicados en la actividad lanosterol (un precursor de triterpenos como el ergosterol) demetilasa están relacionados con la fertilización de plantas (O'Brien et al., 2005).

Aparte de la gran variedad en estructura y función, en general los terpenos presentan una ruta de biosíntesis común, al menos en las etapas iniciales (**Fig. 23**):

1. síntesis de los precursores, isopentenil difosfato (IPP) y dimetila-

lil difosfato (DMAPP)

2. adición repetitiva de IPP para formar diferentes intermediarios prenil difosfato, que son los precursores de las diferentes clases de terpenos

3. formación de las estructuras de los terpenos a partir de enzimas específicas (terpeno sintasas), y modificación de esas estructuras por enzimas modificadoras adicionales que confieren las distintas y diversas propiedades funcionales a los compuestos de esta familia.

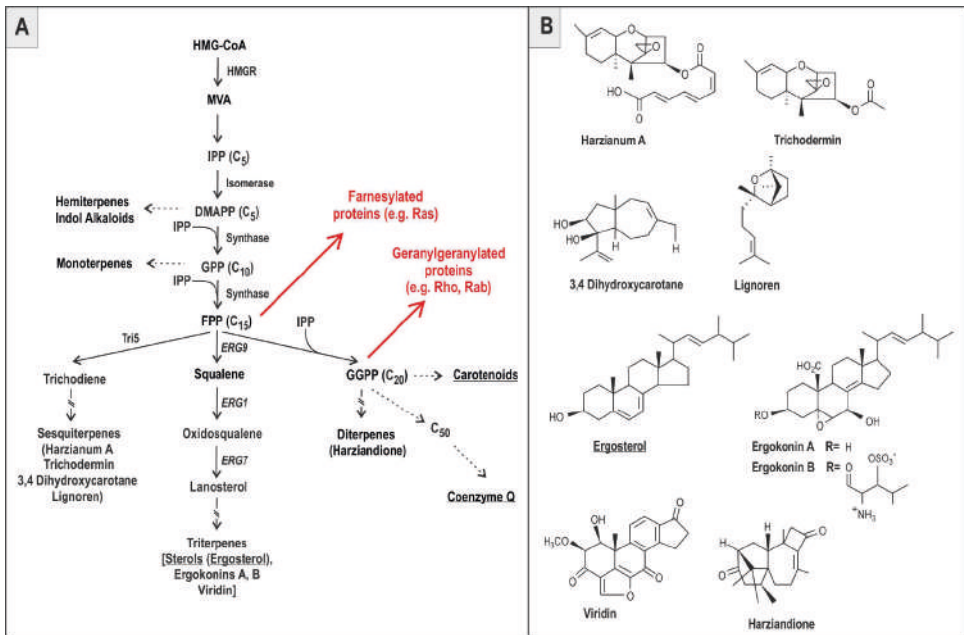


Fig. 23. A. Ruta de biosíntesis de terpenos a partir del hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) hasta farnesil difosfato (FPP) a través de la denominada ruta del mevalonato, seguido de las rutas esquematizadas de biosíntesis de diversos sesquiterpenos, triterpenos y diterpenos que han sido identificados en especies del género *Trichoderma*. Se muestran subrayados los metabolitos primarios también sintetizados por esta ruta. En mayúsculas itálicas se indican algunos de los genes que intervienen en la biosíntesis. MVA, mevalonato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GPP, geranyl difosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato, en rojo se esquematizan las rutas de prenilación de proteínas. **B.** Estructuras químicas de los terpenos más representativos producidos por el género *Trichoderma*.

Los terpenos se clasifican generalmente por el número de unidades

de IPP a partir de las que derivan y por el proceso por el que los anillos que forman el núcleo de la molécula son modificados, lo que a su vez le va a conferir distintas funciones al terpeno producido. En esta biosíntesis el farnesil difosfato (FPP) tiene un papel muy relevante, ya que es un intermediario común a partir del que la ruta se va a ramificar, sirviendo de precursor en la producción de:

1. GGPP y de sus diterpenos y carotenoides derivados
2. Sesquiterpenos
3. Triterpenos y esteroides

FPP y GGPP, además de servir de precursores de diversos grupos de terpenos, participan también en la farnesilación y geranylgeranilización de proteínas, respectivamente. Estos procesos son esenciales (también conocidos en conjunto como procesos de prenilación de proteínas) en la fisiología celular. El FPP farnesila proteínas como **Ras**, codificadas por oncogenes, y que ejercen funciones críticas en el control de la proliferación celular. Por otro lado el GGPP participa en la prenilación de proteínas como: **Rho**, implicadas primariamente en la reorganización del citoesqueleto pero que también participan en la supervivencia de células malignas; **Rab**, que regulan todos los aspectos del tráfico intracelular de membranas, incluyendo la formación de vesículas, movilidad, acoplamiento y fusión (Haney et al., 2017). Estas funciones se han descrito en mamíferos, y la existencia y función de proteínas ortólogas* en hongos no está tan caracterizada en el momento actual (**ortologos: son genes que derivan de un ancestro común en un evento de especiación. Habitualmente tienen funciones equivalentes en sus respectivas especies*).

Uno de los grupos de terpenos que más interés ha despertado en los últimos años han sido los trichotecenos. Son un grupo de sesquiterpenos que presentan en la mayor parte de los casos propiedades tó-

xicas tanto para plantas como para todos los animales ensayados. Son producidos por múltiples géneros de hongos filamentosos, incluyendo *Fusarium*, *Isaria*, *Microcyclospora*, *Myrothecium*, *Peltaster*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* y *Trichothecium* (**Tabla 1**). La mayoría de los hongos productores de trichotecenos son patógenos de plantas, y uno, *Isaria tenuipes*, es un patógeno de insectos. Los trichotecenos producidos por *Fusarium* están entre las micotoxinas de mayor preocupación en relación con la alimentación y seguridad alimentaria. De manera que frecuentemente pueden aparecer como contaminantes en alimentos y en piensos y pueden inducir diarrea, vómitos, anorexia, pérdida de peso, alteraciones inmunológicas y neuroendocrinas, leucocitosis, hemorragias alimentarias, y dermatitis en el hombre y en todos los grupos de animales estudiados (Bonnet et al., 2012). Estos síntomas probablemente son el resultado de la capacidad de los trichothecenos de inhibir la síntesis de proteínas (McLaughlin et al., 1977) y/o inducir apoptosis en células eucariotas (Okumwai et al., 1999). Los trichotecenos también pueden actuar como inmunosupresores (Rotter et al., 1996) y como neurotoxinas (Martin et al., 1986). Por su parte los trichotecenos de *Stachybotrys* se han relacionado con los efectos negativos para la salud de hongos creciendo en edificios con humedades. En contraste, la producción del trichoteceno harzianum A por *Trichoderma arundinaceum* contribuye a su actividad de control biológico frente a algunos patógenos vegetales, y carece de actividad fitotóxica “in vivo”. El núcleo de la estructura de los trichotecenos consta de una molécula con tres anillos, conocida como 12,13-epoxitrichotec-9-ene (EPT) (**Tabla 1**), y los distintos trichotecenos difieren entre ellos en el patrón de sustituyentes unidos al EPT (**Tabla 1**). Uno de estos tipos de variaciones estructurales ha permitido la clasificación de los trichotecenos en dos grupos. Los análogos del primer grupo, los trichotecenos macrocíclicos, tienen un anillo macrocíclico, con un tamaño de entre

12 y 14 aminácidos esterificado vía grupos hidroxilos en los átomos de carbono 4 y 15 (C4 y C15) del EPT. Los análogos del segundo grupo, serían los trichotecenos simples, que carecen del anillo macrocíclico.

Tabla 1. Estructuras representativas mostrando la diversidad de trichotecenos y especies que los producen

La genética y bioquímica de la biosíntesis de la biosíntesis de trichotecenos ha sido estudiada en profundidad inicialmente en *Fusarium*, y las rutas de biosíntesis de los trichotecenos producidos por este género, que tienen un gran impacto en agricultura (ej. Deoxiniva-

Species	Trichothecene name	Trichothecene structure	Trichothecene structure	Trichothecene name	Species
All	12,12-epoxytrichothecene (EPT)			Safratoxin H (macrocyclic trichothecene)	<i>Myrothecium roridum</i> <i>Stachybotrys chartarum</i> <i>Stachybotrys chlorohalonata</i>
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxynivalenol (DON) (3,7,15-trihydroxy-8-keto EPT)			8-Deoxy-Trichothecin (4-O-butenyl EPT)	<i>Spicellum roseum</i>
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	T-2 toxin			Harzianium A (4-O-octatrienyl EPT)	<i>Trichoderma arundinaceum</i>
<i>Isaria tenuipes</i>	4-monoacetoxyscirpenol (3,15-dihydroxy-4-O-acetyl EPT)			Trichodermin (4-O-acetyl EPT)	<i>Trichoderma brevicompactum</i>
<i>Microcycluspora tardicrescens</i>	Trichothecolone acetate (4-O-acetyl-8-keto EPT)			Trichothecin (4-O-butenyl-8-keto EPT)	<i>Trichothecium roseum</i>
<i>Myrothecium roridum</i> <i>Stachybotrys chartarum</i> <i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	Roridin A (macrocyclic trichothecene)				

lenol, nivalenol, toxina T-2) han sido descritas (Alexander et al., 2009). Estudios adicionales indican que al menos los pasos iniciales en la biosíntesis de trichotecenos son similares en *Fusarium*, *Myrothecium* y *Trichoderma*. La biosíntesis de trichotecenos comienza con la ciclación del metabolito primario farnesil difosfato para formar el terpeno trichodieno. Esta reacción es catalizada por una terpeno sintasa (trichodieno sintasa). A continuación, una citocromo P450 monooxigenasa

(trichodieno oxigenasa) cataliza la oxigenación del trichodieno en tres o cuatro posiciones para producir isotrichodiol o isotrichotriol, que se ciclará por un proceso no-enzimático para formar EPT o 3-hidroxi EPT, respectivamente. Estas moléculas serán modificadas por etapas adicionales de oxigenación, acilación y en algunos casos otras modificaciones para formar los más de 150 análogos de trichotecenos que se han identificado (**Fig. 24**).

El cluster de genes de biosíntesis de trichotecenos (*TRI*) es uno de los más estudiados cluster de biosíntesis de metabolitos secundarios (SM) en hongos. Homólogos del cluster *TRI* han sido identificados en todos los hongos productores, e incluso en algunos casos de hongos no productores, ej. *Beauveria*. Existe una variación considerable en la presencia o ausencia de genes *TRI* entre los distintos hongos examinados (**Fig. 25**). El número de genes *TRI* por genoma varía desde seis en *Beauveria* y *Cordyceps* a 15 en *F. sporotrichioides* y *Stachybotrys chartarum* 40293. El número de genes *TRI* varía también dentro de un mismo género y especie. Por ejemplo, el número de genes *TRI* en *S. chararum* varía desde 9 a 15 en las distintas cepas. Algunos genomas pueden llegar a incluir dos o tres parálogos de un mismo gen. Los datos de secuencia también indican que los genes *TRI* pueden encontrarse desde una a cinco diferentes localizaciones genómicas (loci), dependiendo de la especie analizada. En algunos hongos con múltiples loci *TRI*, los genes localizados en distintos loci son parálogos. Por ejemplo, los cluster *TRI* de *Myrothecium* y *Stachybotrys* incluyen nueve y diez genes *TRI* conocidos, respectivamente, pero los genes *TRI* de otros loci son todos parálogos de los genes en el cluster. En *Fusarium* y *Trichoderma*, por el contrario, los genes *TRI* se encuentran en dos o tres loci, pero ninguno de ellos es un parálogo (**Fig. 25**).

La diversidad estructural de los trichotecenos producidos por los

hongos productores de estos compuestos, combinada con la información acerca de su distribución, relaciones filogenéticas y funciones de los genes *TRI* ha permitido proponer un cluster de genes *TRI* ancestral, así como una ruta biosintética derivada de ese cluster. El clus-

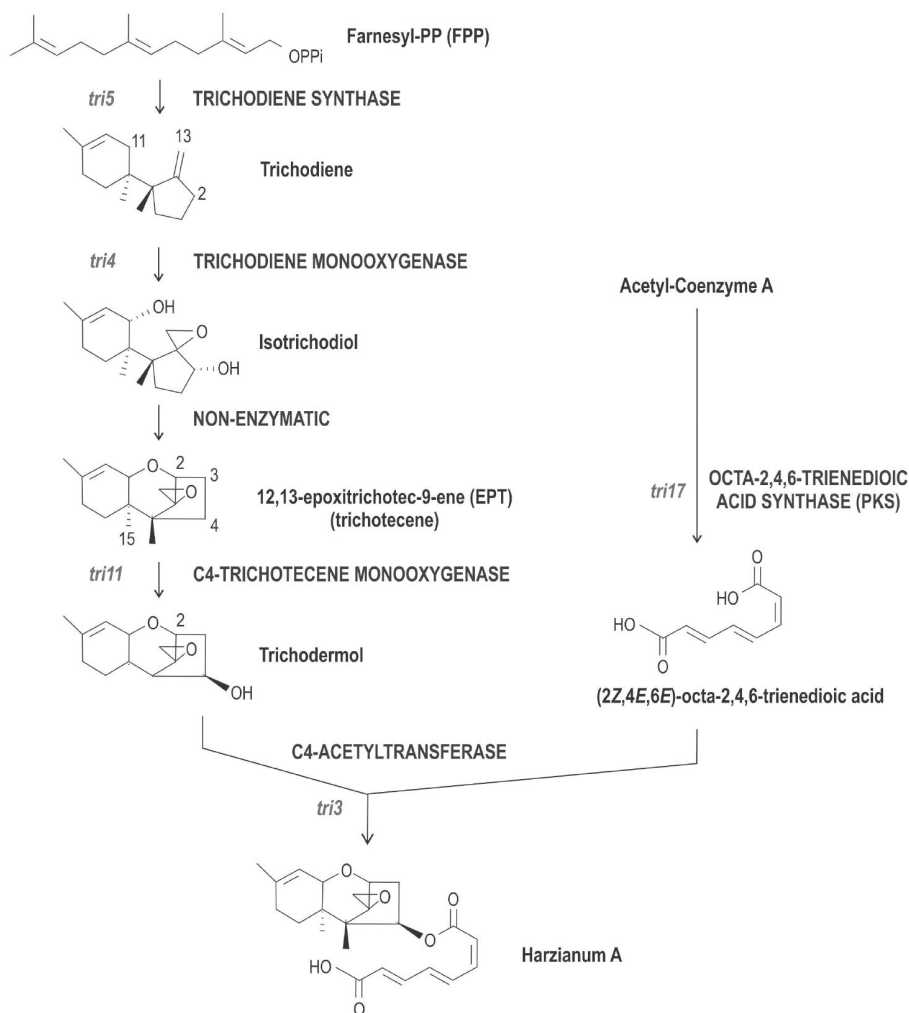


Fig. 24. A. Ruta de biosíntesis de harzianum A, un trichoteceno producido por *Trichoderma arundinaceum*. Se muestran las etapas a partir del FPP (las etapas previas están indicadas en la Fig. 23). Se indican en itálica los genes implicados, en letras mayúsculas las enzimas codificadas por dichos genes. Como se puede observar, en la síntesis de la cadena lateral de ácido octa-trienedioico está implicada una enzima PKS, codificada por el gen *tri17* (Adaptado de Cardoza et al., 2011).

ter ancestral incluiría los genes estructurales *TRI3*, *TRI4*, *TRI5*, *TRI17*, *TRI18* y *TRI22*, los genes reguladores *TRI6* y *TRI10*, el gen transportador *TRI12*, y *TRI14*, cuya función todavía hoy día es desconocida (**Fig. 26**). La presencia de estos 10 genes en el cluster ancestral es coherente con su presencia en todos los hongos analizados, y/o su presencia en los cluster homólogos de los Clades A y B (ver **Fig. 25**).

Con la excepción del gen *TRI18*, las funciones de los genes *TRI* en el cluster ancestral propuesto coinciden con las propuestas en los hongos existentes, y en base a esto se ha podido deducir la ruta biosintética, en la que Tri4 cataliza la oxigenación del trichodieno en las posiciones C2, C11 y C13 para producir EPT. Esta función ancestral del Tri4 sería la razón de la limitada distribución de los homólogos de Tri4 que dan lugar a 3-hidroxi EPT comparado con la más amplia distribución de los Tri4 homólogos que dan lugar a EPT. En la ruta ancestral, la función de Tri3 sería esterificación en C4 más que en C15, esta última característica de los trichotecenos producidos por ejemplo por *Fusarium*.

La ruta biosintética ancestral propuesta lleva a la producción de 4-O-butenoil EPT, un trichoteceno con un poliquétido de cuatro átomos de carbono esterificado al EPT en C4. De manera que el trichoteceno ancestral tendría una cadena lateral sencilla, de sólo cuatro átomos de C, en vez de una mayor de seis u ocho átomos de carbono (ej. octatrienedioato). Una explicación para esta afirmación es que no hay evidencia que existan cerca del gen *TRI17* genes que codifiquen para enzimas modificadoras de poliquétidos, en los tres hongos que producen las cadenas laterales más complejas: *Mirothecium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*. Si la ruta ancestral diera lugar a cadenas laterales más complejas, entonces tendrían los genes codificantes para las enzimas modificadoras; y dado que la tendencia de los genes que participan en la síntesis de SM es a encontrarse formando clusters, sería espera-

ble que dichos genes modificadores de poliQUÉTIDOS se encontraran físicamente ligados a *TRI17*, en aquellos hongos productores de cadenas laterales complejas. Aunque los datos existentes indican que los

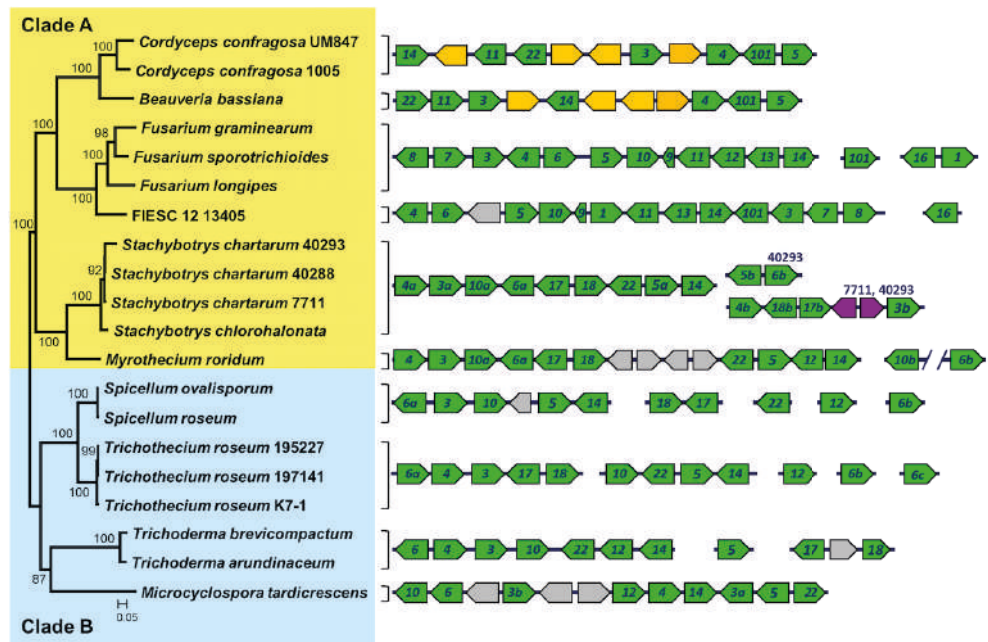


Fig. 25. Contenido y organización de los genes en los loci TRI de diversos hongos productores de trichotecenos. El árbol filogenético de la izquierda se realizó mediante un análisis de máxima probabilidad de secuencias concatenadas de los genes *TRI3*, *TRI5* y *TRI14*, que son los genes TRI comunes a todos los hongos examinados. Los números en cada ramificación son los valores de “bootstrap” basados en 1000 pseudoréplicas. Los sombreados amarillo y azul indican los dos clades (A y B) observados con este estudio filogenético. Valores por debajo del 70% no se muestran. Los **diagramas de la derecha** muestran el contenido y organización de los genes en los distintos loci TRI. Las flechas verdes representan homólogos de genes TRI ya descritos, y los números dentro de cada flecha indican la denominación del gen TRI correspondiente (ej. 14 indica TRI14). El gen TRI22 fue originalmente descrito con TRI11 en *Trichoderma*, pero se ha determinado que ambos son funcionalmente y filogenéticamente diferentes. En esta figura, los genes paralogos se indican con subíndices en letra minúscula a, b, o c; Ej. Los paralogos* de TRI6 se indican como 6a, 6b, y 6c. Las líneas grises representan genes presentes en el cluster TRI de sólo un género; flechas naranjas representan genes únicos de *Beauveria* y *Cordyceps*; y las flechas púrpuras representan genes únicos de *Stachybotrys* y *Myrothecium*. Las flechas que se encuentran sobre una misma línea indican genes localizados en el mismo contig, mientras que las flechas en diferentes líneas indican genes en diferentes contigs. Para *Stachybotrys*, los números 7711 y 40293 por encima de los genes TRI#b paralogos indican el número por el que se denominan las cepas en los que existen dichos paralogos. El gen TRI3b en *S. chartarum* 40293 está truncado en comparación con otros homólogos de TRI3 y como resultado no sería funcional (*paralogos son genes que derivan de un ancestro común por duplicación. Pueden tener funciones relacionadas).

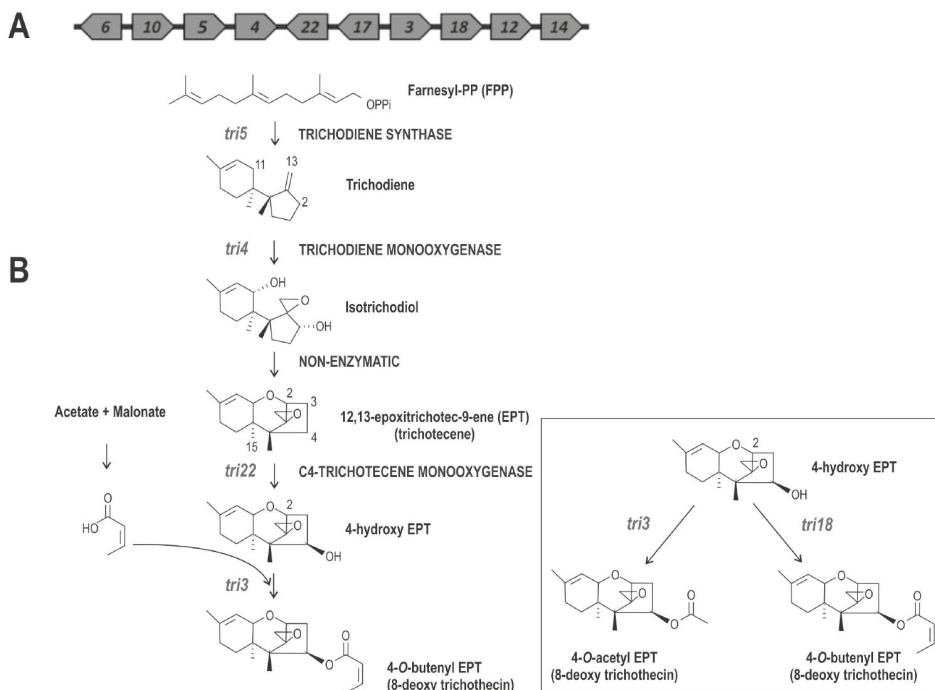


Fig. 26. A. Propuesta de cluster TRI ancestral. El contenido de genes en el cluster ancestral se ha deducido de la distribución de genes *TRI* entre los hongos analizados en la Fig. 25. **B. Propuesta de ruta biosintética ancestral** basada en el contenido de genes del cluster *TRI* ancestral y del conocimiento de las funciones de los genes *TRI*. La presencia de dos genes que codifican para acetil/acil transferasas en el cluster ancestral determina la posibilidad de una ramificación en la ruta ancestral que podría resultar en la producción de dos análogos de trichotecenos: 4-acetil EPT y 4-butenato EPT (Proctor et al., 2017).

genes *TRI* no están necesariamente agrupados en cluster en todas las especies, y que los genes *TRI* pueden perderse y ser sustituidos por otros genes con la misma función, el escenario más probable, con los datos existentes, para la evolución de las cadenas laterales poliquetídicas sería que la ruta ancestral diera lugar a un poliquétido simple de cuatro átomos de carbono, y que los poliquétidos más complejos se originarían por adquisición de genes que codifiquen para enzimas modificadoras de poliquétidos. En la biosíntesis de poliquétidos, la longitud del esqueleto carbonado es controlado por las enzimas PKS (poliquétido sintasas). En la síntesis de trichotecenos, por tanto, el in-

cremento en la longitud de la cadena poliquétida resultaría de cambios en la secuencia de Tri17. En los árboles filogenéticos deducidos de la secuencia de nucleótidos de *TRI17* y genes *PKS* relacionados, los genes *TRI17* de *Spicellum* y *Trichothecium*, que serían los responsables de la síntesis de un poliquétido de cuatro átomos de carbono, forman un clade basal frente a los genes *TRI17* de *Myrothecium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*, que son responsables de la síntesis de poliquétidos de seis y ocho átomos de carbono.

En la ruta biosintética descrita arriba no se menciona la presencia de *TRI18* en el cluster ancestral. *TRI18* codifica una acetil transferasa. Cuando *TRI18* está presente en las secuencias genómicas analizadas, se localiza adyacente o cerca de *TRI17* (ver **Fig. 25**). La ligación física de estos dos genes sugiere que podrían funcionar juntos en la biosíntesis. La posibilidad más obvia es que Tri18, como Tri3, catalice la esterificación del poliquétido derivado de Tri17 al hidroxilo en C4. Los resultados que indican la no completa eliminación de producción de harzianum A en mutantes *tri3-* de *T. arundinaceum*, sugieren la existencia de un gen que puede compensar parcialmente la carencia de Tri3. De manera que en la ruta ancestral, Tri3 y Tri18 catalizan ambos la esterificación en C4. En análisis de delección de genes biosintéticos de metabolitos secundarios, no es habitual que la función de un gen sea compensada por otro localizado en el mismo cluster biosintético o en algún otro lugar del genoma. Sin embargo, otra posibilidad para las funciones de Tri3 y Tri18 en la ruta ancestral de trichotecenos es que ambas enzimas catalizaran la esterificación C4, pero esterificando diferentes moléculas en el hidroxilo C4. Esta diferencia causaría una ramificación en la parte final de la ruta ancestral, con una rama dando lugar a 4-*O*-butenoil EPT (8-desoxi trichotecin) y la otra a 4-*O*-acetil EPT (trichodermin). Es interesante indicar que una ramificación dan-

do lugar a estos dos análogos existe actualmente en *Spicellum roseum*. De este modo *S. roseum* podría representar un fósil viviente con respecto a su ruta de biosíntesis de trichotecenos (Proctor et al., 2017).

2.1.5. Alcaloides

Son producidos por plantas herbáceas contaminadas con *Claviceps purpurea*, formando esclerocios con una forma característica (**Fig. 27**). En estas estructuras es donde se acumulan los ergot alkaloides, o alcaloides del ergot*, que se pueden dividir en tres grupos principales (*ergot es un término que se puede traducir como cornezuelo, o incluso como cornezuelo del centeno):

1. Clavinas,
2. Ácido D-lisérgico y derivados, y
3. Ergopéptidos

Este conjunto de compuestos es conocido tanto por sus efectos ad-

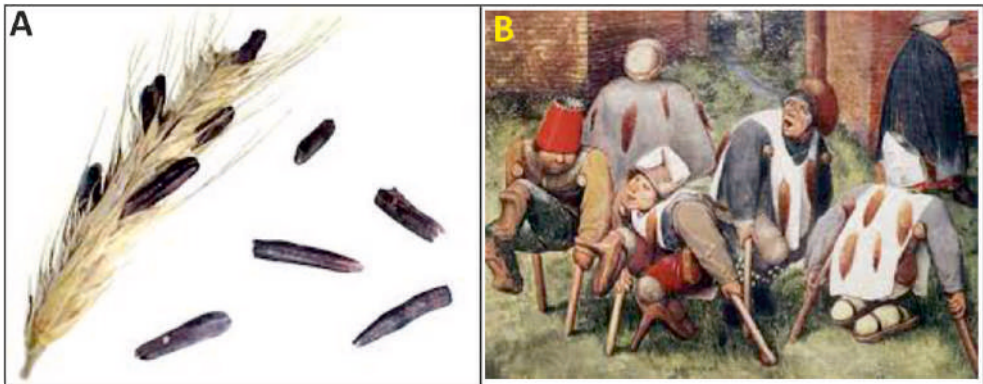


Fig. 27. A. Característicos “cornezuelos del centeno”, de color negro, que se corresponden con los esclerocios de *Claviceps purpurea* una vez que este hongo ha contaminado el cultivo. B. Cuadro de Piether Brueghel “El viejo” (1525-1569), titulado “Los mendigos”, en el que se aprecian las amputaciones resultado del ergostismo o “fuego de San Antonio” por la exposición continuada a los alcaloides producidos por *C. purpurea*, como consecuencia de la contaminación de los alimentos con estas micotoxinas. El cuadro se encuentra expuesto en el Louvre (Paris).

versos, causando el ergostismo en hombre y animales, como por sus efectos beneficiosos debido a sus aplicaciones farmacológicas. El ergostismo se produce por ingestión de alcaloides durante periodos prolongados (pan contaminado, o incluso a través de la leche materna), causa efectos a nivel del sistema nervioso central, espasmos, diarrea, parálisis, alucinaciones, dolores de cabeza..., y también a nivel del sistema circulatorio: vasoconstricción que afecta principalmente a miembros distales y gangrena en estadíos avanzados, pudiendo causar la muerte. Esta es una de las enfermedades humanas más antiguas conocidas producidas por micotoxinas, con las primeras referencias datadas en el año 857, con brotes alrededor del mar Mediterráneo, aunque todavía hoy día se producen brotes asociados a países en desarrollo. Ya se tienen registros "significativos" de dicha enfermedad en la edad media (S. XVI), conocida entonces como "Fuego de San Antonio" debido a los síntomas cutáneos que producía. El tratamiento se debe realizar, una vez eliminado el foco de contaminación, con medicamentos depurativos para eliminar las toxinas del sistema circulatorio. Existen unas 50 especies del género *Claviceps* de las que *C. purpurea* ha sido la más estudiada.

Paradójicamente, estos compuestos también tienen un uso médico, siendo dos los grupos de compuestos de esta familia con aplicación desde este punto de vista:

Derivados del 6,8-dimetilergolina

Derivados del ácido lisérgico

Las preparaciones farmacéuticas más conocidas, **ambos derivados del ácido lisérgico**, serían:

Cafergot (cafeína + ergotamina): utilizado para el tratamiento de las migrañas, y se está investigando su posible utilización en la enfer-

medad de Parkinson.

Ergometrina: Inducción de contracciones del útero y control del sangrado durante el parto.

Además de las actividades anteriores, en la década de los sesenta del siglo pasado, también se utilizaron derivados sintéticos como alucinógenos por algunos colectivos. El ejemplo más representativo fue el LSD (dietilamida del ácido lisérgico). Es una droga semisintética psicodélica, provoca alteraciones en el pensamiento, visuales, y distorsiona la percepción del espacio y tiempo, fue considerada en los sesenta como una droga recreativa, no es adictiva, y finalmente puede presentar efectos psiquiátricos adversos como paranoias y alucinaciones. El LSD fue sintetizado por primera vez en 1938, se intentaron desarrollar aplicaciones en psiquiatría a partir de 1947, e incluso fue utilizado por la CIA (“Central Intelligence Agency”, USA) para control mental, o supuestamente en guerra química. Finalmente se descartó su utilización en los años setenta y se abandonaron las investigaciones, que han sido retomadas nuevamente en el año 2009.

La biosíntesis de estos compuestos está bien caracterizada (Tudzyński et al., 1999; Hulvova et al., 2013), y se puede dividir en cuatro etapas (**Fig. 28**):

1. Prenilación del triptófano (Trp) con el dimetilalil difosfato (DMAPP) por la enzima DMATS (Dimetilalil-triptófano-sintasa, gen *dmaW*) para dar lugar al DMAT.

2. Metilación del DMAT mediante una metiltransferasa, que utiliza la S-adenosil-metionina como donador del grupo metilo.

3. Oxidaciones y ciclaciones que dan lugar a la formación de chaoclavina-I, por la acción de un FAD-oxidoreductasa (gen *easA*); pos-

teriormente es oxidada por una alcohol deshidrogenasa (gen *easD*) para dar lugar a chanoclavina-I aldehído, que finalmente es ciclada por la enzima agroclavina sintasa, codificada por el gen *easG*, para dar lugar a la agroclavina. Posteriormente, La acción consecutiva de dos monooxigenasas dará lugar primero a la elimoclavina que en una segunda etapa de oxidación, llevada a cabo por otra P450-monooxigenasa (gen *cloA*), será transformada en el ácido D-lisérgico.

4. Activación del ácido lisérgico por la LPS2, que se corresponde con un módulo de un NRPS, y condensación con un tripéptido que es producido por una segunda NRPS trimodular (LPS1) para finalmente dar lugar a la ergotamina.

La producción industrial de ergot-alcaloides se realiza a partir de *Claviceps purpurea*. No obstante la secuenciación de genomas de numerosos hongos filamentosos ha permitido detectar regiones en hongos principalmente de los géneros *Trichoderma* y *Metarhizium*, conteniendo genes ortólogos a los que se encuentran en el cluster EAS de *C. purpurea* (**Fig. 29**), con lo que sería factible que estos hongos produzcan

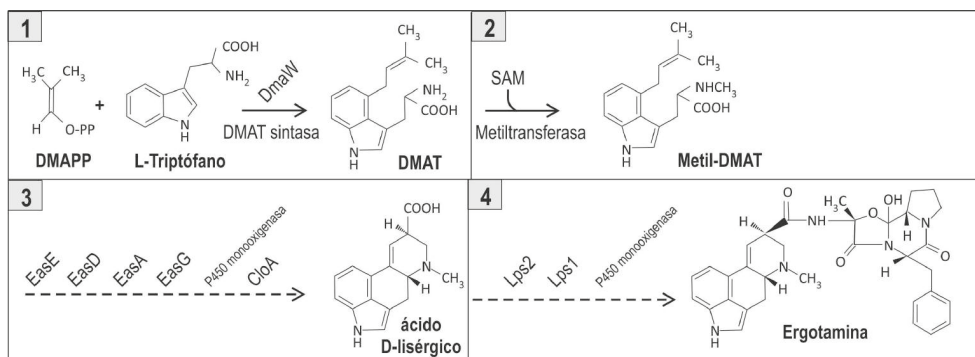


Fig. 28. Biosíntesis de ergot alcaloides en *Claviceps purpurea*, se ha dividido la ruta de biosíntesis en los cuatro bloques indicados en el texto. DMAPP, dimetilalil difosfato; DMAT, dimetilaliltriptófano. Se indican en la parte superior de las flechas las enzimas propuestas que llevan a cabo las distintas etapas de la biosíntesis.

ergot-alcaloides. Sin embargo, ninguno de estos géneros adicionales contiene todos los genes identificados en *C. purpurea*, con lo es probable que los ergot alcaloides producidos por estos hongos sean diferentes a los ya descritos en *Claviceps*.

2.2. Lucha Biológica.

La utilización de hongos en la lucha biológica frente a plagas que afectan a cultivos se remonta a casi 80 años. Dentro de estos, aquellos pertenecientes al género *Trichoderma* han atraído especial atención, y han sido objeto de nuestro trabajo en las últimas dos décadas. Los hongos de este género tienen gran cantidad de genes que están implicados en control biológico de enfermedades vegetales así como en

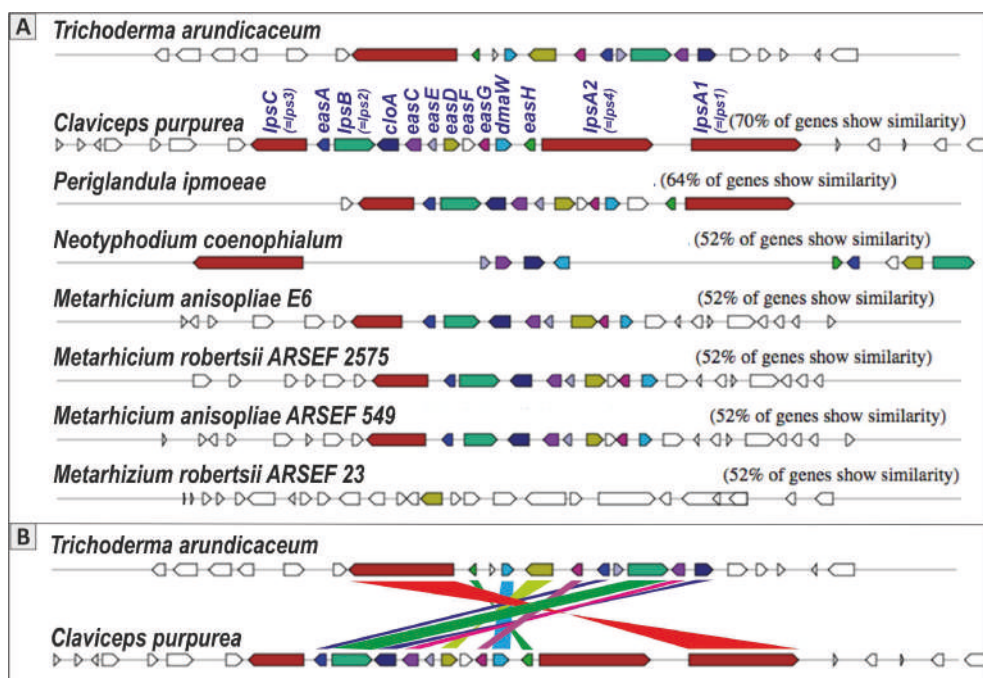


Fig. 29. A. Esquema de los cluster ortólogos al cluster de síntesis de ergot-alcaloides (EAS) de *Claviceps purpurea*, detectados en los genomas de otros hongos filamentosos. B. Análisis de sintenia entre los cluster EAS de *C. purpurea* y *T. arundinaceum* (datos no publicados). Los genes *Ips3* y *Ips4* participan en la síntesis de otros alcaloides adicionales, como la ergometrina y la ergopeptina, respectivamente, y se encuentran sólo en algunas especies (Hulvova et al., 2013).

colonización de gran variedad de sustratos. Además de ello tienen un alto valor biotecnológico entre otros aspectos por su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas y gran variedad de metabolitos secundarios con gran interés aplicado. Tienen, por tanto, gran capacidad de colonizar la rizosfera y de estimular el crecimiento de las plantas, así como de inducir la respuesta defensiva en planta frente a organismos fitopatógenos.

Las enfermedades vegetales, en particular las causadas por agentes patógenos (bacterias, virus, viroides y especialmente hongos fitopatógenos) provocan cada año cuantiosas pérdidas en la producción agrícola y en la calidad de los alimentos con los consecuentes problemas económicos, no sólo debidos a la menor producción, sino también al coste de la eliminación de dichas enfermedades y a la necesidad del saneamiento de la población vegetal, lo que se refleja en última instancia en un aumento de los precios de los alimentos básicos (**Tabla 2**)(Oerke 2006). Además, no sólo las cosechas se ven afectadas, también el material almacenado (grano, fruta, etc.) puede ser infectado (Monte, 2001). Históricamente se han utilizado pesticidas químicos para el control de enfermedades vegetales (control químico), pero el abuso y su mala aplicación han tenido numerosos efectos adversos, de los cuales cabría destacar la aparición de patógenos resistentes a dichas sustancias y las consecuencias nocivas sobre el medio ambiente y organismos no objeto de ese control (Vinale et al., 2008). Todo esto ha creado la necesidad de buscar alternativas surgiendo el concepto de control biológico, cuya primera definición apareció en 1919 como “la regulación de la población de una plaga por sus enemigos naturales”. Posteriormente, Baker y Cook (1974) propusieron una definición mucho más precisa: “El control biológico consiste en la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno

o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas". Sin embargo, debido al desarrollo de nuevas técnicas de Biología Molecular, esta definición se ha quedado obsoleta, por lo que la Academia Nacional de las Ciencias de los EE.UU. (NAS, 1987) propuso una nueva: "la utilización de organismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables, y para favorecer organismos útiles para el hombre, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos beneficiosos". No obstante no hay que olvidar las limitaciones de los agentes de control biológico (ACBs) ya que tienen un rango de acción más limitado frente a los patógenos que los pesticidas químicos. Lo que tiende a aplicarse en la actualidad es un control integrado que combina el uso de ACBs con pequeñas cantidades de sustancias químicas obteniéndose niveles de supresión de la enfermedad semejantes a los observados con tratamientos químicos pero con la enorme ventaja de producir menores efectos adversos (Monte, 2001).

Tabla 2. Pérdidas en cultivos de distintas regiones del mundo debido a patógenos vegetales (Oerke 2006).

Continent	Wheat		Rice		Maize	
	Loss in US \$ billion	% loss	Loss in US \$ billion	% loss	Loss in US \$ billion	% loss
Asia	5.6	14	16.3	12	3.8	13
North America	2.0	14	0.1	7	3.4	8
Latin America	0.6	13	0.9	14	2.2	13
Europe	3.7	12	0.1	9	1.2	10
Africa	0.4	12	0.7	14	1.7	16
Oceania	0.6	14	0.01	7	0.01	8
World	12.9	13	18.1	11	12.3	11

2.2.1. *Trichoderma* como agente de control biológico.

Para el control de enfermedades vegetales se han aplicado especies antagonistas de hongos fitopatógenos (agentes de control biológico, = ACB), de las cuales el 90% corresponde a distintas cepas de *Trichoderma* (Benítez et al., 2004). Una pequeña lista de hongos diana de *Trichoderma* incluye: *Botrytis*, *Dematophora*, *Fusarium*, *Nectria*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus* y *Sclerotinia* (**Fig. 30**). Se sabe que *Trichoderma* es capaz de controlar ascomicetos, basidiomicetos, oomicetos (Benítez et al., 2004), nematodos (Goswami et al., 2008), e incluso plagas de insectos (Rodríguez-González et al., 2017). Es interesante destacar la resistencia de algunas especies de *Trichoderma* a varios fungicidas y fumigantes químicos usados habitualmente en agricultura (ej. Captan) y también a otros tratamientos dirigidos a disminuir la carga microbiana del suelo. Esto, junto a la velocidad de crecimiento y la fácil adaptación a diversas condiciones climáticas conferiría a *Trichoderma* una ventaja sobre otros hongos en la colonización de suelos. Un aspecto negativo es que se conocen algunas especies de *Trichoderma* que, bajo determinadas condiciones ambientales, son capaces de atacar cultivos de patata, maíz o manzanos, entre otros (Hjeljord y Tronsmo, 1998), sin embargo, este género tiende a ser considerado en su conjunto como no fitopatógeno. Por tanto, el éxito de *Trichoderma* como ACB se debe a la confluencia de factores:

1. Elevada capacidad de germinación
2. Eficiencia en la utilización de nutrientes
3. Gran capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos
4. Eficacia para promover el crecimiento y los mecanismos de defensa de la planta



Fig. 30. Ejemplo de la capacidad de biocontrol de *Trichoderma*. Se puede observar el efecto del tratamiento de semillas de lechuga con esporas de *Trichoderma hamatum* frente a los patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (**macetas superiores**) o *Rhizoctonia solani* (**macetas inferiores**). Las plantas control aparecen a la izquierda y las tratadas con *T. hamatum* a la derecha (Foto tomada del BBSRC “Biotechnology and Biological Sciences Research Council”).

El biocontrol puede ser ejercido por *Trichoderma* por tres mecanismos generales (**Fig. 31**):

1. Micoparasitismo, mecanismo en el que se da el contacto físico entre el patógeno y *Trichoderma* (ACB), y se producen enzimas hidrolíticas, toxinas y/o antibióticos (**Fig. 32**).

2. Antibiosis, relativo a la capacidad de *Trichoderma* de producir y/o resistir a metabolitos que impiden la germinación de esporas (fungistasis), que matan células (antibiosis) o que modifican la rizosfera (Howell, 2003)

3. Competición, en cuanto a la capacidad de *Trichoderma* de competir en condiciones ventajosas respecto a los microorganismos competidores de la rizosfera.

No obstante, aunque los tres mecanismos indicados anteriormente son los más reconocidos, en los últimos años se han descrito otros

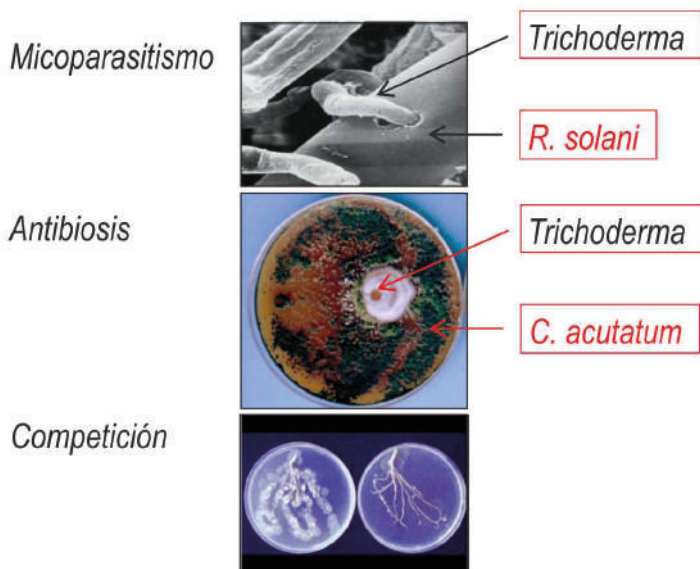


Fig. 31. Mecanismos de biocontrol de *Trichoderma*. *R. solani*, *Rhizoctonia solani*; *C. acutatum*, *Colletotrichum acutatum*.

procesos que se podrían considerar mecanismos complementarios o variantes de los anteriores, como es el caso de la regulación de la biosíntesis de botridial (BOT), un sesquiterpeno fitotóxico producido por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, por metabolitos secundarios también sesquiterpénicos, como el harzianum A, producidos por *Trichoderma arundinaceum*. La producción del HA reprime la expresión de los genes de biosíntesis de BOT por parte del patógeno. Sería por tanto una variante del mecanismo de antibiosis, pero dirigido no sólo a la inhibición del crecimiento del patógeno, sino adicionalmente a reducir en este la producción de fitotoxinas, que suponen uno de sus principales factores de virulencia (Malmierca et al., 2016a, b).

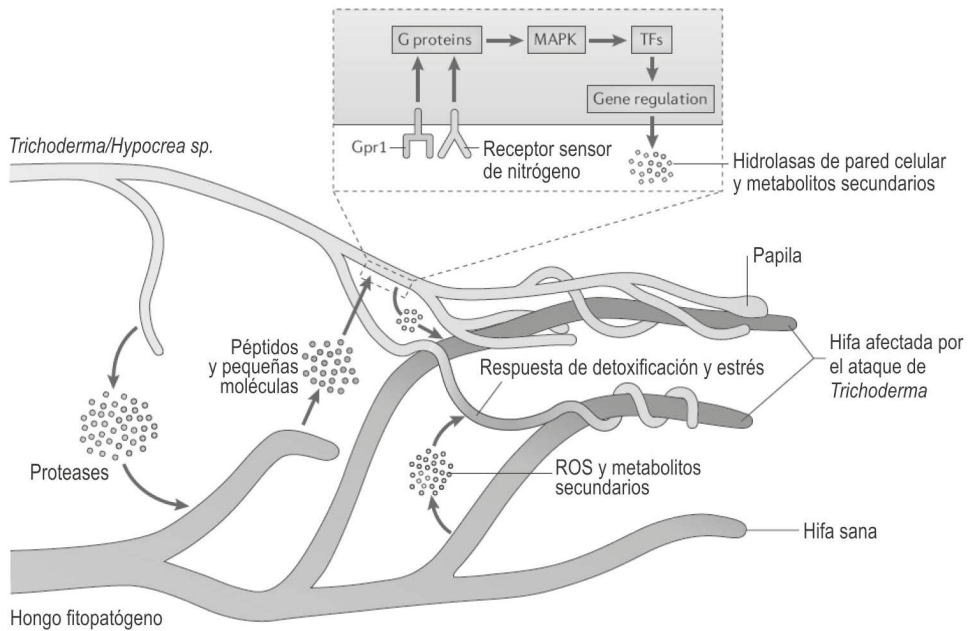


Fig. 32. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp en la comunidad microbiana del suelo. *Trichoderma* reconoce un hongo fitopatógeno (la presa) a través de moléculas que son liberadas por el patógeno; algunas de estas moléculas pueden ser pequeños péptidos que son liberados por la acción de proteasas secretadas de forma constitutiva por *Trichoderma* antes del contacto. Estas moléculas pueden unirse a receptores acoplados a proteína G (como Gpr1), o a receptores sensores de nitrógeno en la superficie de las hifas de *Trichoderma*, induciendo (elicitando) una cascada de señalización que incluye proteínas G y protein kinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que modularían finalmente la actividad de factores de transcripción (TFs) desconocidos en este momento. Estos factores inducirían la expresión constitutiva de genes que codifican enzimas para la biosíntesis de metabolitos secundarios y para la lisis de la pared celular. Las lectinas (proteínas de unión a azúcares que son altamente específicas del azúcar al que se unen y tienen un papel de reconocimiento a nivel celular y molecular) del patógeno y proteínas conteniendo módulos de unión a celulosa de las hifas de *Trichoderma* colaborarían en la unión de *Trichoderma*-presa. Al mismo tiempo, el fitopatógeno responde produciendo metabolitos secundarios y especies reactivas de oxígeno (ROS) que eliciten una respuesta de estrés y detoxificación en *Trichoderma* (tomado de Druzhinina et al., 2011).

2.2.2. Interacciones *Trichoderma*-planta

Los efectos beneficiosos de *Trichoderma* como ACB no se deben sólo a su actividad antagonista frente a organismos fitopatógenos, sino también a un efecto directo sobre las plantas y su ambiente. Los efectos beneficiosos sobre las plantas incluyen la promoción del crecimiento, la tolerancia a estreses abióticos y la inducción de la respuesta

defensiva frente a patógenos.

Las cepas de *Trichoderma* con reconocida influencia sobre las plantas deben ser buenas competidoras en la rizosfera y han de ser capaces de colonizar las raíces, lo que ha provocado que en los últimos años se les haya redefinido como endosimbiontes de plantas (Harman et al., 2004). Según estas teorías, las especies de *Trichoderma* actúan como simbioses de plantas, oportunistas y avirulentos, capaces de colonizar las raíces mediante mecanismos similares a los empleados por hongos micorrícicos y de producir compuestos que promueven el crecimiento de las plantas y/o inducen sus sistemas de defensa (**Fig. 33**). Como simbioses, reciben nutrientes de las plantas (a través de exudados de las raíces) y un nicho que colonizar, mientras que mejoran la toma de nutrientes por parte de las raíces y protegen a la planta frente a estreses tanto bióticos como abióticos (Woo y Lorito, 2006).

La colonización implica una habilidad de reconocimiento y adherencia a la raíz, la entrada del hongo en la planta y la resistencia a metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a esa invasión (Hermosa et al., 2012). En estos procesos participan un gran número de enzimas y compuestos, como hidrofobinas y proteínas similares a expansinas en el reconocimiento y la adherencia (Viterbo y Chet, 2006; Brotman et al., 2008) o endopoligalacturonasas en la degradación de la pared celular de plantas (Morán-Díez et al., 2009). Las reacciones del hospedador frente a la invasión de *Trichoderma* suelen tener lugar en el sitio de entrada: las deposiciones de callosa engrosando la pared celular son muy eficaces a la hora de restringir el crecimiento del hongo en los espacios intercelulares de la epidermis y el córtex, impidiendo su entrada al sistema vascular (Yedidia et al., 1999). También se produce una acumulación de compuestos antimicrobianos, de naturaleza fenólica, sintetizados por la planta en el lugar de penetración del hongo. La

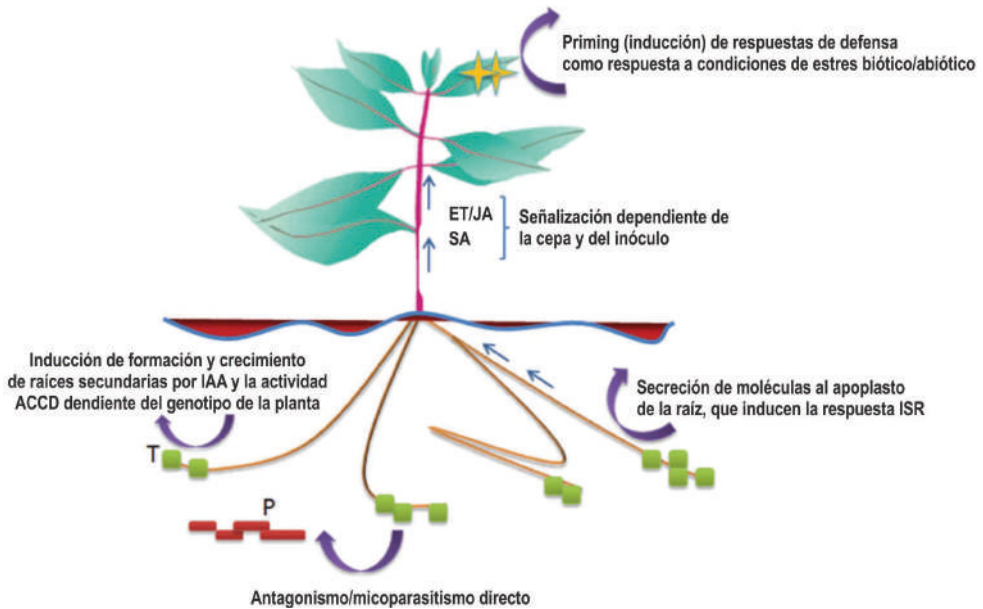


Fig. 33. Representación esquemática de la señalización molecular *Trichoderma*-planta y de los efectos de inducción en las plantas. T, *Trichoderma*; P, patógeno; IAA, ácido 3-indol-acético; ACCD, ACC desaminasa; ET, etileno; JA, ácido jasmónico; SA, ácido salicílico; ISR, resistencia sistémica inducida (tomado de Hermosa et al., 2012).

capacidad de colonización depende en gran medida de la tolerancia del hongo a estos metabolitos, resistencia que en *Trichoderma* ha sido atribuida a la presencia de gran número de genes que codifican para transportadores ABC (Ruocco et al., 2009).

Diversos estudios (recogidos en Shoresh et al., 2010) han revelado que la interacción *Trichoderma*-planta da lugar a cambios en el transcriptoma y proteoma de la planta. Los compuestos fúngicos implicados en la inducción de respuestas en la planta incluyen:

- **Enzimas hidrolíticas:** xilanasas, celulasas, endoquitinasas, endopoligalacturonasas, etc. Inducen en la planta la expresión de genes relacionados con defensa, la biosíntesis de fitoalexinas, el crecimiento de la raíz o la resistencia a enfermedades (Morán-Díez et al., 2009).

- **Metabolitos secundarios:**

Peptaiboles: son pequeños péptidos lineales (de entre 7 y 20 residuos) producidos por una péptido sintetasa no ribosomal (ver sección 2.1.2.). Se ha demostrado su actividad antimicrobiana y su capacidad para inducir respuestas de defensa en plantas.

Trichotecenos: compuestos sesquiterpénicos que en la mayor parte de los casos tienen propiedades fitotóxicas, excepto el harzianum A producido por *Trichoderma arundinaceum* (ver sección 2.1.4.) (Malmierca et al., 2012).

- **Oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular:** inducen la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con patogenicidad (PR), la lignificación en el lugar de la infección y la generación de ROS, y también reducen la respuesta defensiva en la planta.

2.2.2.1. Efecto de Trichoderma en la resistencia de las plantas a estreses abióticos

- **Estrés hídrico:** en condiciones normales, las plantas bajo estrés hídrico sufren cambios fisiológicos como el cierre de los estomas o la reducción de la tasa de fotosíntesis neta, lo que provoca, si ese estado de estrés se prolonga durante demasiado tiempo, una situación de hambruna, la parada del crecimiento y posiblemente la muerte del organismo. Las plantas tratadas con *Trichoderma* son mucho más resistentes a estados de déficit de agua. Este tratamiento provoca una serie de cambios en la planta, perdurables a lo largo del tiempo, tales como la inducción del metabolismo de carbohidratos y de las proteínas implicadas en la fotosíntesis o el acúmulo de almidón en las hojas, lo que permite un mayor aporte de nutrientes y energía destinados a mantener el crecimiento de la planta (Bae et al., 2009; Shores y Harman, 2008a).

- **Estrés salino:** el exceso de salinidad provoca en las plantas altera-

ciones del balance hídrico e iónico en los tejidos y estreses secundarios como el oxidativo (Munns, 1993). En general, *Trichoderma* puede alterar el estatus nutricional de las plantas, incrementando su contenido en potasio y calcio (dos de los principales elementos deficitarios en plantas bajo estrés salino) (Yedidia et al., 2001; Yildirim et al., 2006).

- **Estrés térmico:** se ha demostrado que las plantas de tomate sometidas a temperaturas extremas (tanto frío como calor) sufren menos daño si están tratadas con *T. harzianum* (Shoresh et al., 2010).

- **Estrés oxidativo:** en condiciones de estrés severo, pueden acumularse ROS generando daños celulares. En estudios proteómicos de raíces inoculadas con *Trichoderma* se observan niveles aumentados de superóxido dismutasa, peroxidasa y otras enzimas de detoxificación de ROS (Shoresh y Harman, 2008a).

2.2.2.2. Otros efectos beneficiosos sobre las plantas del tratamiento con Trichoderma

- **Promoción del crecimiento:** el efecto de *Trichoderma* sobre el crecimiento de las plantas tiene una larga duración, pudiendo incluso durar toda la vida de las plantas anuales (Harman, 2000). El tratamiento incrementa el crecimiento de raíces y tallos, el porcentaje de germinación, el contenido en peso seco, almidón y azúcares (Shoresh y Harman, 2008a).

Esta característica se ha comprobado en numerosos cultivos y plantas ornamentales, observándose un incremento en la altura, diámetro y/o peso seco de las plantas, así como en el porcentaje de germinación, número de botones florales y/o área de las hojas (ver **Fig. 30**). Para explicar esta estimulación del crecimiento se han sugerido varios mecanismos: la producción de factores de crecimiento, el control de pa-

tógenos menores, o la conversión de material no utilizable en formas que puedan ser asimiladas por las plantas. En el caso de algunas especies de *Trichoderma*, también podrían facilitar el efecto potenciador de bacterias saprófitas (Vrany et al., 1990) y de hongos micorrícicos (Calvet et al., 1993).

- **Mejora de la eficiencia fotosintética:** la activación de las defensas de la planta por parte de *Trichoderma* tiene un coste metabólico elevado. Esta energía extra proviene del aumento de la capacidad fotosintética y de las tasas de respiración de la planta inducidas por *Trichoderma* (Shoresh y Harman, 2008b).

- **Aumento de la toma de nutrientes:** varias especies de *Trichoderma* son capaces de solubilizar nutrientes presentes en el suelo necesarios para la planta, haciéndolos fácilmente asimilables por las raíces. Dentro de estos nutrientes se incluye el fósforo y micronutrientes como el hierro, cobre, zinc y magnesio (Altomare et al., 1999).

- **Mejora de la eficiencia de utilización de nitrógeno:** *Trichoderma* induce la expresión de la nitrato reductasa en plantas, enzima que convierte el nitrato en iones amonio (necesarios para el metabolismo del nitrógeno), mejorando la productividad y el crecimiento vegetal (Harman, 2000).

2.2.2.3. *Obtención de cepas modificadas de Trichoderma y efecto sobre su capacidad de biocontrol*

Como se ha descrito en los apartados anteriores, *Trichoderma* es un género que ha sido estudiado debido a sus notables propiedades de interés aplicado, en cuanto a su capacidad de producción de gran variedad de metabolitos, enzimas, y también por su gran capacidad de colonizar la rizosfera y de interaccionar con la plantas, proporcionándoles beneficios en cuanto a crecimiento y defensa. No obstante, hasta

el inicio de este siglo los avances en la biología molecular de este género habían sido muy escasos. De esta manera entre los años 2002 y 2005 se desarrolló un proyecto de genómica funcional “TrichoEST”, que fue llevado a cabo por un Consorcio Internacional formado 10 grupos, entre los que se encontraban tanto instituciones académicas e investigadoras como empresas. En este proyecto participó el laboratorio de Microbiología del Campus de Ponferrada (Universidad de León), que en este caso formó una unidad con el grupo de la Universidad de Salamanca. El nombre completo del proyecto fue “Genómica Funcional y Proteómica de cepas antagonistas de *Trichoderma* por la Industria y Agricultura”, y uno de sus principales objetivos fue profundizar en el proceso de biocontrol de *Trichoderma*. Como resultado del mismo se identificó numerosas ESTs (“Expressed Sequence Tags”, fragmentos de genes expresados) que podían ser interesantes desde el punto de vista aplicado. Para coseguirlo se desarrollaron diversos procedimientos y/o plataformas moleculares y bioinformáticas que fueron muy útiles para la caracterización posterior de los genes. El análisis de las ESTs permitió identificar gran variedad de genes con potencial interés en las funciones de biocontrol y de interacción con la planta (Vizcaíno et al., 2006).

Los genes seleccionados se estudiaron utilizando varios enfoques, pero sin duda uno de los que dio mejores resultados fue la de obtener transformantes sobreexpresando o silenciando los genes de interés en el propio *Trichoderma*.

Como primer ejemplo se expresaron genes que codifican para HSP (“heat shock proteins”- proteínas de respuesta a choque térmico). La función de estas proteínas está relacionada con la respuesta a temperaturas extremas y otras condiciones de estrés. En estas condiciones las HSPs actúan como chaperonas, previniendo la agregación indu-

cida por el estrés de proteínas parcialmente desnaturalizadas, promoviendo la recuperación de sus conformaciones nativas cuando las condiciones favorables se recuperen. La sobreexpresión de una sHSP, o HSP de pequeña masa molecular ("small HSP" - de aproximadamente 24 kDa.), incrementó notablemente la termotolerancia de los transformantes, aunque no afectó a su capacidad antifúngica (Montero-Barrientos et al., 2007). Por otro lado, también se sobreexpresó el gen *hsp70*, que pertenece a una familia que se compone de genes altamente conservados, algunos de los cuales son inducibles por calor y las enzimas que codifican juegan importantes papeles como chaperonas. Los transformantes con este gen sobreexpresado acumulan más biomasa y muestran un mayor crecimiento bajo condiciones de estrés osmótico, salino y oxidativo, después de haber sido sometidos a un choque térmico (**Fig. 34**) (Montero-Barrientos et al., 2008).

Finalmente, otro ejemplo representativo sería el silenciamiento del que *Thpg1* que codifica para una endopoligalacturonasa (PG1). Para entender la función de estas enzimas es importante tener en cuenta que *Trichoderma* spp. puede generar una respuesta en plantas similar a la resistencia sistémica inducida (ISR) por rizobacterias. Algunos oligómeros de pared celular (CW) podrían actuar como moléculas elicitoras liberadas por plantas después del ataque del patógeno (Woo et al., 2006). Estos incluyen oligogalacturonidos (OGA), que son fragmentos de homogalacturonanos activos biológicamente (HGA) con un tamaño entre 2 y 20 residuos de ácido galacturónico. OGA liberados a partir de pectinas están relacionados con respuestas defensivas y también modulan crecimiento y desarrollo vegetal (Casasoli et al., 2008; Ridley et al., 2001).

La pectina es un componente importante de la CW de las plantas y las pectinasas se encuentran entre las primeras enzimas producidas

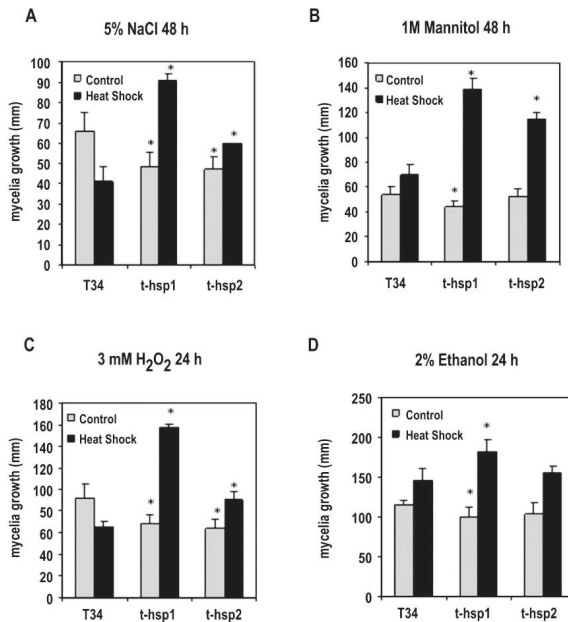


Fig. 34. Crecimiento de los transformantes de *T. harzianum* sobreexpresando el gen *hsp70* (cepas t-hsp1 y t-hsp2), después de un choque térmico a 45°C durante 2 horas, comparado con la cepa silvestre (T34).

durante el ataque fúngico a las plantas (Annis and Goodwin 1997). Estas enzimas están implicadas en el corte de los tres dominios de la pectina: HGA, rhamnogalaturonano-I y rhamnogalaturonano II. Las endopoligalacturonasas (endoPG) catalizan la hidrólisis de los enlaces alfa-1,4-galacturónico entre dos residuos no metilados de ácido galacturónico del HGA, liberando oligogalacturónidos.

La identificación del gen *Thpg1*, que codifica para una endopoligalacturonasa, permitió determinar que su expresión se inducía en presencia de un patógeno en el sistema *Trichoderma*-planta.

Los mutantes silenciados en el gen *Thpg1* (cepa ePG5), tenían una menor capacidad de colonizar raíces y también conferían una menor protección in vivo a plantas de tomate frente al patógeno *Botrytis cinerea*. Finalmente en la interacción con *Arabidopsis* (planta modelo) se

encontraron 10 genes vegetales que estaban regulados negativamente en la presencia de ePG5 en comparación con la cepa silvestre, seis de los cuales estarían implicados en la construcción de la CW o en su degradación o en respuestas defensivas en plantas. Otros estarían implicados en defensa de la planta. Esta regulación negativa de genes relacionados con la ISR podría indicar un menor nivel de protección frente a fitopatógenos (Morán-Díez et al., 2009).

2.2.2.4. Efecto de la expresión de genes de Trichoderma en plantas, sobre la respuesta a condiciones de estrés

Las plantas responden a los ataques de patógenos mediante la expresión de una amplia variedad de genes, la mayoría relacionados con los mecanismos de defensa molecular. Tanto los ataques de patógenos como los estreses abióticos, como la salinidad y la sequedad, reducen la producción vegetal en todo el mundo. Se han hecho muchos intentos para conferir resistencia a patógenos e incrementar la tolerancia a estreses abióticos en plantas de interés agronómico. Una de las estrategias más extendidas ha sido sobreexpresar genes vegetales que se inducen en condiciones de estrés biótico y abiótico. Complementariamente, también se han hecho esfuerzos para reforzar la respuesta vegetal mediante la introducción de genes heterólogos con un reconocido efecto antipatógeno. Las quitinasas pueden jugar un doble papel, inhibiendo el crecimiento de los hongos mediante la digestión de su pared celular y mediante la liberación de elicitors liberados del patógeno que inducirían reacciones de defensa en el hospedador. Plantas transgénicas que sobreexpresan quitinasas de diversos orígenes han demostrado exhibir niveles mejorados de resistencia a infecciones fúngicas y un retraso en los síntomas de la enfermedad cuando se enfrentan a hongos patógenos.

Un ejemplo representativo es el de la quitinasas y glucanasas pro-

ducidas por *Trichoderma*, estas enzimas han demostrado ser potentes inhibidores de patógenos de plantas y son capaces de lisar no sólo las partes blandas del ápice de las hifas sino también las partes más duras de quitina de las hifas maduras, conidios, clamidosporas y esclerocios, actividad que en el caso de las quitinasas de las plantas es mucho menos potente. Por estas razones se han abordado en diversos estudios la expresión de genes de *Trichoderma* que codifican para quitinasas en plantas. Un ejemplo fue la expresión del gen *chit42*, que codifica para una quitinasa de *T. harzianum*, en plantas de tabaco y patata (Lorito et al., 1998). Como resultado se obtuvo una mayor resistencia de las plantas transgénicas frente a patógenos como *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani* (**Fig. 35**).

Un segundo ejemplo sería la expresión de los genes *chit42* y *chit33*, que codifican para dos quitinasas de *T. harzianum*, juntos o por separado, también en plantas de tabaco. Se pudo observar que en las plantas transgénicas se mejoraba significativamente la tolerancia frente a hongos y bacterias patógenas, y también se incrementaba la producción de peroxidasa aniónica y de Proteínas PR, implicadas en la respuesta a patógenos. Además se mejoraba la resistencia a diversas condiciones de estrés abiótico, como estrés salino y altas concentraciones de metales (Dana et al., 2006).

Finalmente, la expresión del gen *hsp70* en *Arabidopsis thaliana*, que codifica para una proteína de respuesta a choque térmico (“heat shock protein”), importante para conferir termotolerancia a *Trichoderma*, así como tolerancia cruzada a estreses osmótico, salino y oxidativo (Montero-Barrientos et al., 2008), permitió determinar un mayor nivel de germinación de las semillas de los transgénicos de *A. thaliana* en comparación con el control cuando fueron sometidos a un tratamiento de estrés térmico (“heat-shock”), indicando una termotolerancia mayor

que el control. Además las líneas transgénicas mostraron un mayor nivel de germinación y crecimiento en medios con NaCl, manitol o H₂O₂ que las cepas control, después de ser sometidas a un tratamiento térmico (Montero-Barrientos et al., 2010).

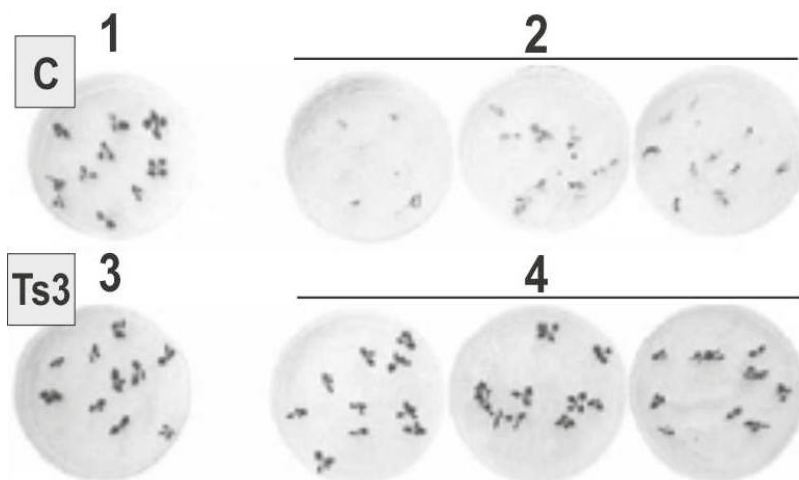


Fig. 35. Resistencia de plantas transgénicas de tabaco frente a *R. solani*. 1 y 3, son controles de plantas control, crecidas en sustrato no infectado con *R. solani*; 2 y 4 son plantas crecidas en sustrato con *R. solani*; 1 y 2 plantas control, no transgénicas (C); 3 y 4, plantas de tabaco transgénicas (Ts3), expresando el gen *chit42* de *T. harzianum*.

2.2.3. Utilización de *Trichoderma* en el mundo

Debido a todas estas cualidades positivas, el tratamiento de cultivos, tanto herbáceos como leñosos, o de plantas ornamentales con diferentes especies de *Trichoderma* está muy extendido en todo el mundo (**Fig. 36**), incluso en algunos países como Cuba o Venezuela su utilización está financiada por el gobierno, con el fin de reducir tanto los costes de la agricultura como el impacto ambiental provocado por pesticidas y fertilizantes químicos. Sin embargo, todavía estamos muy lejos de explotar al máximo *Trichoderma* como hongo de biocontrol debido a la elevada variedad genética presente dentro del género, que hace que

algunas especies sean buenas promotoras del crecimiento e induzcan las defensas ISR, mientras que otras no tienen ningún efecto y algunas incluso tienen efectos negativos (Harman, 2006). Así pues, los efectos de *Trichoderma* varían dependiendo de la planta, e incluso del cultivar específico a tratar (Tucci et al., 2011).

Una vez que los mecanismos implicados en la interacción *Trichoderma*-planta se conozcan completamente o al menos en mayor profundidad, se podrán definir los puntos clave que ha de cumplir una buena cepa de biocontrol, y se podrá utilizar de forma más generalizada y segura, obteniéndose mejores resultados tanto a nivel de producción como de resistencia y eliminación de enfermedades en los cultivos.

En la actualidad existen numerosos productos comerciales basados en distintas formulaciones de *Trichoderma*, con eficacia frente a hongos fitopatógenos de los que afectan con mayor frecuencia a cultivos de



Fig. 36. Utilización estimada de productos agrícolas basados en *Trichoderma* (biopesticidas, bioinoculantes, biofertilizantes, agentes para fortalecimiento de plantas, protectores de plantas, etc.). El tamaño de los puntos rojos indica la proporción relativa de esos productos en cada país (Imagen tomada de Lorito et al., 2010).

importancia económica (**Tabla 3**). En Europa, la muy estricta normativa comunitaria ha hecho que este tipo de productos proliferen lentamente, pero es muy probable que en un futuro se extienda su utilización por lo que suponen de beneficio medioambiental, sobre todo al permitir una reducción en la utilización de pesticidas químicos, consiguiendo así una mayor sostenibilidad del proceso productivo.

Tabla 3. Ejemplo de productos comerciales basados en agentes de biocontrol del Género *Trichoderma* (adaptado de Mayo 2017).

Materia activa	Nombre comercial	Control/efectos	Casa comercial
<i>T. asperellum</i> T18	PRODIGY	<i>Phytophthora</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp.	AMC Chemical (España)
<i>T. asperellum</i> T34	T34 BIOCONTROL	Hongos patógenos de suelo	Biocontrol Technologies S.L. (España)
<i>T. harzianum</i>	ROOTSHIELD	<i>R. solani</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.	BioWorks (EEUU)
<i>T. harzianum</i>	SUPERSITVIT	Estimulación del crecimiento	Borregaard Bioplant (Dinamarca)
<i>T. harzianum</i> (KRL-AG2)	TRI 002	Estimulación del crecimiento, fortalecimiento de las plantas frente a patógenos	Plant Support (Holanda)
<i>T. harzianum</i> (PV 5736-89)	SUPERSIVIT	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp.	Fytovita (República Checa)
<i>T. harzianum</i> + <i>T. viride</i>	TUSAL	<i>Phoma</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.	Certis Europe (Holanda)
<i>T. harzianum</i> T22	PHC T-22	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Cylindrocleftidium</i> spp., <i>Thielaviopsis</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp.	BioWork Inc. (EEUU)
<i>T. virens</i>	ROOT MATE	<i>Phytophthora</i> spp.	Biowork Inc (EEUU)
<i>T. viride</i>	ECOFIT	<i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp.	Hoechst Schering AgrEvo (India)
<i>Trichoderma</i> spp.	TRICHOJET, TRICHOPEL, TRICHODOWELS, TRICHOSEAL	<i>Armillaria</i> spp., <i>Botryosphaeria</i> spp., <i>Chondrosternum</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Nectria</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp.	AgriMm Technologies (Nueva Zelanda)

2.3. Genomas Fúngicos.

Los hongos, con un número estimado de 1.5 millones de especies, representan uno de las más grandes ramas del Árbol de la Vida, con un enorme impacto en muchas actividades humanas y en el funcionamiento de los ecosistemas, debido a sus diversas funciones como organismos descomponedores, patógenos, y simbiotes. Además, posiblemente más que ningún otro grupo de microorganismos no fotosintéticos, los hongos son elementos biológicos esenciales en el ciclo global del carbono. Colectivamente, son capaces de degradar casi cualquier biopolímero natural existente además de la mayoría de los producidos por el hombre. Por todo ello, los hongos presentan notable interés en el desarrollo por ejemplo de combustibles alternativos, en el secuestro de CO₂ y en la biorremediación de ecosistemas contaminados.

El uso de los hongos filamentosos para el beneficio continuado del ser humano, requiere un preciso conocimiento de cómo estos organismos interactúan con comunidades naturales o sintéticas. La capacidad de muestrear diversidad de ambientes para analizar complejos metagenomas fúngicos, es una realidad muy próxima a ser alcanzada, y será una parte importante en el aprovechamiento de los hongos para su aplicación en proyectos relacionados con la industria, energía y clima. Sin embargo, nuestra capacidad para analizar estos datos depende de la disponibilidad de genomas fúngicos bien caracterizados.

Para rellenar este vacío en nuestro entendimiento de la diversidad fúngica, se llevó a cabo un proyecto de cinco años, con la participación de numerosos investigadores internacionales y la colaboración del "Joint Genome Institute (JGI)" del "Department of Energy" de los Estados Unidos, para secuenciar 1000 genomas fúngicos, pertenecientes a toda la diversidad de hongos existente. Fruto de esta iniciativa

se secuenciaron al menos dos genomas de referencia de cada una de las aproximadamente 500 familias reconocidas de hongos. Además de este esfuerzo, realizado por el JGI, otras instituciones científicas en todo el mundo han avanzado en este campo, con lo que podemos considerar que el número de genomas de hongos accesibles superaría ampliamente los 2000 genomas (**Fig. 37**), lo que supone una fuente de información de gran valor, que ya hoy día impregna todas las líneas de investigación, no sólo en hongos, sino también en el resto de organismos (bacterias, plantas, animales y ser humano), en los que en la mayoría de los casos los conocimientos en el campo de la genómica se encuentran mucho más avanzados que en los hongos.

A este extraordinario desarrollo sin duda ha contribuido el desarrollo de las técnicas y equipamientos relacionados con la secuenciación de nueva generación (NGS), que ha permitido que entre los años 2005-2007 se redujeran de forma exponencialmente negativa los precios de secuenciación de genomas. De manera que la secuenciación de un genoma, que en el año 2007 se calculaba en un precio de aproximadamente 10 millones de dólares, en la actualidad pueda realizarse por menos de 1000 dólares, y probablemente en no más de dos-tres años a partir de este momento, no supere los 500 dólares. Esta reducción en el precio, o en definitiva el incremento de la capacidad de los equipos de secuenciación ha sido muy superior al que se podría predecir haciendo una asimilación a lo que la ley de Moore propuso para la evolución de la capacidad de los discos duros de los ordenadores, planteando que el número de transistores en los microprocesadores se duplicaría cada dos años, que es lo mismo que decir que la capacidad de los discos duros se duplicaría cada dos años (Moore 1965) (**Fig. 37**). Esta hipótesis que en el caso de los avances informáticos se ha ido cumpliendo, sin embargo en el caso de la eficiencia de los equipos de secuenciación ha

ido mucho más rápido, y por tanto los precios se han reducido también mucho más rápidamente (**Fig. 37**).

En la **Tabla 4**, de forma ilustrativa, se muestran los datos de los genomas de algunos hongos filamentosos que han sido tratados en esta memoria, en los que se pueden ver los tamaños de sus genomas, así como el número de contigs (fragmentos de secuencia discretos obtenidos como resultado del proceso de secuenciación y de su posterior procesamiento), y el número de genes en cada genoma.

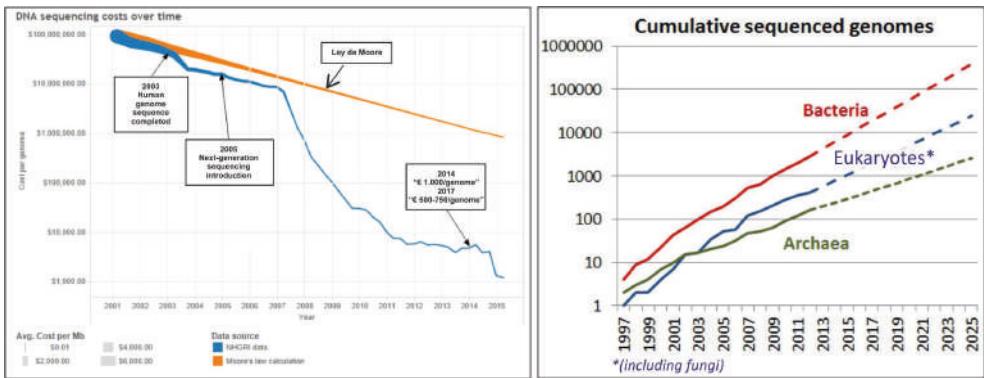


Fig. 37. Graficas ilustrando (**panel de la izquierda**) como ha evolucionado a lo largo de los años el coste en dólares de la secuenciación de ADN en comparación con la evolución previsible en función de la ley de Moore, establecida en 1965 para predecir la evolución de la capacidad de almacenamiento de los discos duros de los ordenadores existentes en cada momento (Moore 1965). Nótese el rápido descenso de los precios de secuenciación con la introducción de la tecnología NGS (“next generation sequencing” - “nueva generación de secuenciación”) a partir de los años 2005-2007; (**panel de la derecha**) evolución hasta la actualidad y previsión hasta el año 2025 del número de genomas secuenciados en Eucariotas (incluidos hongos), Bacterias y Archaeas [datos tomados del “NHGRI (National Human Genome Research Institute) genome sequencing program (GSP)].

Tabla 4. Información acerca de las secuencias de algunos genomas de hongos filamentosos productores de trichotecenos (ver apartado 2.1.4).

Species ^a	Lifestyle	Genome Size (MB)	No. Contigs	No. Genes	N50
<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogen/endophyte	33,697,794	1,229	10,364	84,720
<i>Cordyceps confragosa</i>	Insect pathogen	32,603,708	8,204	8,126	9,866
FIESC 12 ^b	Plant pathogen	31,177,521	1,091	10,090	112,688
<i>Fusarium graminearum</i>	Plant pathogen	36,565,771	435	13,313	184,591
<i>Fusarium longipes</i>	Plant pathogen	35,314,733	544	11,461	144,380
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Plant Pathogen	37,430,056	447	12,015	235,034
<i>Microcycluspora tardicrescens</i>	Plant pathogen	26,207,243	1,071	10,378	169,506
<i>Myrothecium roridum</i>	Plant pathogen	45,146,520	2,310	14,215	54,581
<i>Spicellum ovalisporum</i>	Saprophyte	32,638,560	880	9,497	91,139
<i>Spicellum roseum</i>	Saprophyte	34,127,646	1,156	10,426	168,957
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Saprophyte	36,879,702	3,848	11,530	55,709
<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	Saprophyte	34,390,047	5,591	10,706	47,022
<i>Trichoderma arundinaceum</i>	Saprophyte	36,872,412	1,370	10,539	134,831
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	Saprophyte/ Plant pathogen	37,043,576	1,404	10,467	57,298
<i>Trichothecium roseum</i>	Saprophyte/ Plant pathogen	33,891,741	1,468	9,759	77,986

^a Estos hongos proceden de las siguientes instituciones: *Beauveria* – Richard Humber, Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF); *Cordyceps* – Timothy James, Biology Department at the University of Michigan; *Fusarium* and *Myrothecium* – Agriculture Research Service (NRRL) Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, U.S. Department of Agriculture; *Microcycluspora* – Hans Josef Schroers at Agricultural Institute of Slovenia; *Spicellum* and *Trichothecium* (DAOM strains) – Keith A. Seifert, Ottawa Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada; *Trichoderma* – Ulf Thrane, IBT Culture Collection of Fungi, Mycology Group, Technical University of Denmark; *Trichothecium* – Anne E. Desjardins, National Center for Agricultural Utilization Research, U.S. Department of Agriculture (*datos tomados de Proctor et al., 2017*). N50, es la longitud del contig más pequeño que representa el 50% del genoma; es decir en el caso de *Beauveria bassiana* N50= 84,740 bp, lo que indica que sumadas las longitudes de todos los contigs con este tamaño o superior, representarían el 50% del genoma, es una medida de la calidad del proceso de secuenciación y un valor mayor suele indicar una mayor calidad, aunque siempre hay que tener en cuenta las propiedades intrínsecas del genoma concreto, sobre todo del microorganismo del que se ha aislado el DNA genómico).

3. CONCLUSIÓN.

Desde el punto de vista biotecnológico los hongos filamentosos son un modelo del que el ser humano ha obtenido muchos beneficios. Muchos de los metabolitos producidos por estos organismos han sido esenciales en el desarrollo de la humanidad, y han permitido curar enfermedades que en épocas anteriores habían causado grandes pandemias con pérdidas de millones de vidas. Por otro lado su estudio también ha permitido identificar las causas de plagas que afectan a cultivos, provocando grandes pérdidas económicas y en algunos momentos carencia de alimentos. Todo este conocimiento ha permitido nuestro progreso, pero las posibilidades que nos ofrecen los hongos filamentosos para el futuro son posiblemente inimaginables hoy en día. La aparición de las técnicas genómicas y transcriptómicas ha permitido determinar que en el mejor de los casos, es decir, en los casos de los hongos mejor caracterizados, estamos aprovechando un porcentaje muy bajo de su potencial biosintético, no más allá de un 5%, con lo que debemos esperar que en un futuro no muy lejano puedan aparecer nuevos metabolitos y aplicaciones de los hongos filamentosos que le sean al ser humano de gran utilidad.

No quiero terminar esta lección sin enfatizar que todos estos descubrimientos no serían posibles sin la inversión necesaria, que en todo caso siempre proporciona importantes retornos a la sociedad, sobre todo en forma de puestos de trabajo, y un ejemplo de ello es el pujante tejido empresarial biotecnológico de la Provincia de León, con un número muy significativo de empresas de este sector de renombre internacional.

He dicho.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, N.J., Proctor, R.H., McCormick, S.P.** 2009. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* **28**: 198-215.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E.** 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2926-2933.
- Álvarez, E., Meesschaert, B., Montenegro, E., Gutiérrez, S., Díez, B., Barredo, J.L., Martín, J.F.** 1993. The isopenicillin-N acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* has isopenicillin-N amidohydrolyase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single *penDE* gene. *European Journal of Biochemistry* **215**: 323-332.
- Ames, B.D., Nguyen, C., Bruegger, J., Smith, P., Xu, W., Ma, S., Wong, E., Wong, S., Xie, S., Li, J.W.-H., Vederras, J.C., Tang, Y., Tsai, S.-C.** 2012. Crystal structure and biochemical studies of the trans-acting polyketide enoyl reductase LovC from lovastatin biosynthesis. *Proceedings of the National Academic of Science* **109**: 11144-11149.
- Annis, S. E., Goodwin, P. H.** 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 1-14.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., Höfte, M.** 2008. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 709-719.
- Backus, M.P., Stauffer, J.F.** 1955. The production and selection of

- a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia* **47**: 429-463.
- Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S-H., Strem, M.D., Melnick, R.L., Bailey, B.A.** 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* **60**11: 3279-3295.
- Baker, K.F., Cook, R.J.** 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman and company, San Francisco.
- Barredo, J.L., Cantoral, J.M., Álvarez, E., Díez, B., Martín, J.F.** 1989. Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Molecular and General Genetics* **216**: 91-98.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C.** 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* **7**: 249-260.
- Bonnet, M.S., Roux, J., Mounien, L., Dallaporta, M., Troadec, J.D.** 2012. Advances in deoxynivalenol toxicity mechanisms: the brain as a target. *Toxins* **4**: 1120-1138.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., Chet, I.** 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology* **147**2: 779-789.
- Butler, G.** 2010. Fungal sex and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. **23**: 140-159.
- Calvet, C., Pera, J., Barea, J.M.** 1993. Growth response of marigold *Tagetes erecta* L. to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant Soil* **148**1: 1-6.
- Cardoza, R.E., Malmierca, M.G., Hermosa, M.R., Alexander, N.J.,**

- McCormick, S.P., Proctor, R.H., Tijerino, A.M., Rumero, A., Monte, E., Gutiérrez, S.** 2011. Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthetic genes in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4867-4877
- Casoli, M., Spadoni, S., Lilley, K. S., Cervone, F., De Lorenzo, G., Mattei, B.** 2008. Identification by 2-D DIGE of apoplastic proteins regulated by oligogalacturonides in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 8: 1042-1054
- Chen, W., Chen, R., Liu, Q., He, Y., He, K., Ding, X., Kang, L., Guo, X., Xie, N., Zhou, Y., Lu, Y., Cox, R.J., Molnár, I., Li, M., Shao, Y., Chen, F.** 2017. Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *The Royal Society of Chemistry* 8: 4917-4925.
- Claydon, N., Allan, M., Hanson, J.R., Avent, A.G.** 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the british Mycological Society* 88: 503-513.
- Crawford, L., Stepan, A.M., McAda, P.C., Rambosek, J.A., Conder, M.J., vice, V.A., Reeves, C.D.** 1995. Production of cephalosporin intermediates by feeding adipic acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* strains expressing ring expansion activity. *Bio/Technology* 12: 58-62.
- Dana, M.M., Pintor-Toro, J.A., Cubero, B.** 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* 142: 722-730.
- DeModena, J.A., Gutiérrez, S., Velasco, j., Fernández, F.J., Fachini, R.A., Galazzo, J.L., Hughes, D.E., Martin, J.F.** 1993. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved

- by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* **11**: 926-929.
- Díez, B., Mellado, E., Rodríguez, M., Fouces, R., Barredo, J.L.** 1997. Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics. *Biotechnology and Bioengineering* **55**: 216-226.
- Druzhinina, i.S., Seidl-Siboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwithz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P.** 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 749-759.
- Felnagle, E.A.; Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, A.D., McMahan, M.D., Thomas, M.G.** 2008. Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Molecular Pharmacology* **5**: 191-211.
- Fesel, P.H., Zuccaro, A.** 2016. β -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology* **90**: 53-60.
- Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B., Gutiérrez, S., Fernández, F.J., Martín, J.F.** 1995. The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 6200-6204.
- Fisch, K.M.** 2013. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS-NRPS. *Royal Society for Chemistry Advances* **3**: 18228-18247.
- Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E., Butler, G.** 2006. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from spuer tree and combined gene analysis. *BMC Evolutionary Biology* **6**:99.
- Garnica, A., Barrera, S., Muñoz, E., Raya, J., Méndez, A., Macías, L., Ruiz, L.F., López, J.** 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-

- one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist* **209**:1496-1512.
- Gershenson, J., Dudareva, N.** 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* **3**:408-414.
- Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., Dewan, M.M., Sivasithamparam, K.** 1990. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant Soil* **121**:287-291.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J.M., Barrero, J.M., Piqueras, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., Serrano, R., Rodríguez, P.L.** 2002. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**:1833-1846.
- Goswami, J., Pandey, R.K., Tewari, J.P., Goswami, B.K.** 2008. Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Environmental Science Health B*. **433**: 237-40.
- Goswami, E., Vidyarthi, A.S., Bhunia, B., Mandal, T.** 2013. A review on lovastatin and its production. *Journal of Biochemical Technology* **4**: 581-587.
- Gutiérrez, S., Díez, B., Álvarez, E., Barredo, J.L., Martín, J.F.** 1991. Expression of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Molecular and General Genetics* **225**: 56-64.
- Gutiérrez s., Velasco, J., Fernández, F.J., Martín, J.F.** 1992. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase close-

- ly related to homoserine O-acetyltransferase. *Journal of Bacteriology* **174**: 3056-3064.
- Haney, S.L., Wills, V.S., Wiemer, D.F., Holstein, S.A.** 2017. Recent advances in the development of mammalian geranylgeranyl diphosphate synthase inhibitors. *Molecules* **22**: E886.
- Hanson, J.R.** 2005. The chemistry of the bio-control agent, *Trichoderma harzianum*. *Science Progress* **88**: 237-248.
- Harman, G.E.** 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* **84**: 377-93.
- Harman, G.E.** 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **962**: 190-94.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M.** 2004 *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **21**: 43-56
- Heil, M., Silva Bueno, J.C.** 2007. Within plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**: 5467-5472.
- Hermosa, R., Cardoza, R.E., Rubio, M.B., Gutiérrez, S., Monte, E.** 2014. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Eds. V.K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, I. Druzhinina, R.S. Upadhyay, M. Tuohy. Elsevier. Chapter **10**, pp- 125-137.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E.** 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* **158**: 17-25.
- Hjeljord, L., Tronsmo, A.** 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an Overview. In *Trichoderma and Gliocladium* vol. 2. C.P. Kubicek and G.E. Harman eds. Taylor and Francis, Lon-

dres, Reino Unido, pp. 115-133

- Hoffmeister, D., Keller, N.P.** 2007. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Products Reports* **24**: 393-416.
- Howell, C.R.** 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* **87**: 4-10.
- Hulvova, H., Galuszka, P., Frébortová, J., Frébort, I.** 2013. Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnology Advances* **31**: 79-89.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W.** 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 937-947.
- Liu, W., Christenson, S.D., Standage, S., Shen, B.** 2002. Biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027. *Science* **297**:1170-1173.
- Lora, J.M., Pintor-Toro, J.A., Benítez, T., Romero, L.C.** 1995. Qid3 protein links plant bimodular proteins with fungal hydrophobins. *Molecular Microbiology* **18**: 380-382.
- Lorito, M., Woo, S.L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoi-na, A., Tuzun, S., Scala, F.** 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **95**: 7860-7865.
- Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E., Monte, E.** 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 395-417.
- Ma, S.M., Li, J.W.-H., Choi, J.W., Zhou, H., Michael Lee, K.K., Noorthie, V.A., Xie, X., Kealey, J.T., Da Silva, N.A., Vedera, J.C.,**

- Tang, Y.** 2009. Complete reconstitution of a highly reducing iterative polyketide synthase. *Science* **326**: 589-592.
- Magel, E., Mayrhofer, S., Muller, A., Zimmer, I., Hampp, R., Schnitzler, J.P.** 2007. Photosynthesis and substrate supply for isoprene biosynthesis in poplar leaves. *Atmospheric Environment* **40**: 5138-5151.
- Malmierca, M.G., Barua, J., McCormick, S.P., Izquierdo-Bueno, I., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., Hermosa, R., Collado, I.G., Monte, E., Gutiérrez, S.** 2015. Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defence priming. *Environmental Microbiology* **17**: 1103-1118.
- Malmierca, M.G., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Hermosa, M.R., Monte, E., Gutiérrez, S.** 2012. Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and in the induction of plant defense related genes. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 4856-4868.
- Malmierca, M.G., Izquierdo-Bueno, I., McCormick, S.P., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., Moraga, J., Gomes, E.V., Proctor, R.H., Collado, I.G., Monte, E., Gutiérrez, S.** 2016a. Botrydial and botcinins produced by *Botrytis cinerea* regulate expression of *Trichoderma arundinaceum* involved in trichothecene biosynthesis. *Molecular Plant Pathology* **17**: 1017-1031.
- Malmierca, M.G., Izquierdo-Bueno, I., McCormick, S.P., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., Barua, J., Lindo, L., Casquero, P.A., Collado, I.G., Monte, E., Gutiérrez, S.** 2016b. Trichothecenes and aspinolides produced by *Trichoderma arundinaceum* regulate expression of *Botrytis cinerea* genes involved in virulence and growth. *Environmental Microbiology* **18**: 3991-4004.

- Martin, L.J., Doebler, J.A., Anthony, A.** 1986. Scanning cytophotometric analysis of brain neuronal nuclear chromatin changes in acute T-2 toxin-treated rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **85**: 207-214.
- Mayo, S.** 2017. Evaluación de *Trichoderma* spp. en el control biológico de *Rhizoctonia solani* y la respuesta defensiva en plantas de alubia pertenecientes a la IGP "Alubia La Bañeza-León". *Universidad de León*. Tesis Doctoral.
- McLaughlin, C.S., Vaughan, M.H., Campbell, I.M., Wei C.M., Stafford, M.E., Hansen, B.S.** 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes, p. 276-273. In J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, M.A. Mehlman (ed.), *Mycotoxin in human and animal health*. Patholox Publishers, College Park, M.D.
- Monte, E.** 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* **4**: 1-4.
- Montero-Barrientos, M., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Monte, E., Hermosa, M.R.** 2007. The heterologous overexpression of *hsp23*, a small heat shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. *Current Genetics* **52**: 45-53.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Nicolás, C., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Monte, E.** 2008. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1506-1513.
- Montero-Barrientos, M, Hermosa, R., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Nicolás, C., Monte, E.** 2010. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* **167**: 659-665.
- Moore, G.E.** 1965. Cramming more components onto integrated

circuits. *Proceedings of the IEEE (Institute of Electrical and Electronics Engineers)* **86**: 82-85.

Moran-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Lorito, M., Monte, E. 2009. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **228**: 1021-1031.

Munns, R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* **161**: 15-24.

NAS (National Academy of Sciences). 1987. Biological Control in Managed Ecosystems. National Academy Press, Washington DC, 55.

O'Brien, M., Chantha, S.C., Rahier, A., Matton, D.P. 2005. Lipid signaling in plants. Cloning and expression analysis of the obtusifoliol 14 α -demethylase from *Solanum chacoense* Bitt., a pollination- and fertilization-induced gene with both obtusifoliol and lanosterol demethylase activity. *Plant Physiology* **139**: 734-749.

Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144**: 31-43.

Okumwai, H., Yoshino, H., Suglura, Y., Sugumata, M., Hintikka, E.L., Jarvis, B., Ueno, Y. 1999. Trichothecenes as potent inducers of apoptosis, p. 221-231. In E. Johannig (ed.), *Bioaerosols, fungi and mycotoxins: health effects, assessment, prevention and control*. Boyd Printing Co., Inc., Albany, NY.

Proctor, R.H., McCormick, S.P., Hye-Seon, K., Cardoza, R.E., Stanley, A.M., Lindo, L., Kelly, A., Brown, D.W., Lee, T., Vaughan, M.M., Alexander, N.J., Busman, M., Gutiérrez, S. 2017. Evolution of structural diversity of trichthecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi.

(Enviado a *PLOS Pathogens*).

- Reithner, B., Brunner, K., Schuhmacher, R., Peissl, I., Seidl, V., Krska, R., Zeilinger, S.** 2005. The G protein a subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 749-760.
- Reithner, B., Schuhmacher, R., Stoppacher, N., Pucher, M., Brunner, K., Zeilinger, S.** 2007. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1123-1133.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., Mohnen, D.** 2001. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929-967.
- Rodríguez-González, A., Mayo, S., González-López, O., Reinoso, B., Gutiérrez, S., Casquero, P.A.** 2017. Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Environmental Monitoring and Assessment* **189**: 12.
- Rodríguez-Sáiz, M., Díez, B., Barredo, J.L.** 2005. Why did the Fleming strain fail in penicillin industry?. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 464-470.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J.** 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* **48**: 1-34.
- Rubio, M.B., Hermosa, R., Reino, J.L., Collado, I.G., Monte, E.** 2009. *Thctf1* transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal

- activity. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 17-27.
- Ruiz-Herrera, J.** 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. Boca Raton: CRC Press. p. 248.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., Woo, S.L., Lorito, M.** 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **223**: 291-301.
- Samson, S.M., Dotzlar, J.F., Slisz, M.L., Becker, G.W., Van Frank, R.M., Vela, L.E., Yeh, W.K., Miller, J.R., Queener, S.W., Ingolia, T.D.** 1987. Cloning and expression of the fungal expansae/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Bio/Technology* **5**: 1207-1214.
- Saupe, S.J., Kuldau, G.A., Smith, M.L., Glass, N.L.** 1996. The product of the *het-C* heterokaryon incompatibility gene of *Neurospora crassa* has characteristics of a glycine-rich cell wall protein. *Genetics*. **143**: 1589-1600.
- Sharkey, T.D., Wiberley, A.E., Donohue, A.R.** 2008. Isoprene emission from plants: Why and How. *Annals of Botany* **101**: 5-18.
- Shirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., Kubicek, C.P.** 1994. Parallel formation and synergisms of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4364-4370.
- Shoresh, M., Harman, G.E.** 2008a. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiology* **147**: 2147-2163.

- Shoresh, M., Harman, G.E.** 2008b. The relationship between increased growth and resistance induced in plants by root colonizing microbes. *Plant Signaling & Behavior* **39**: 737-739.
- Shoresh, M., Harman, G.E., Mastouri, F.** 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 21-43.
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., Lorito, M.** 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology* **12**: 341-354.
- Tudzynski, P., Hölter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N., Keller, U.** 1999. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Molecular and General Genetics* **261**: 133-141.
- Ullán, R.V., Casqueiro, J., Bañuelos, O., Fernández, F.J., Gutiérrez, S., Martín, J.F.** 2002. A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 46216-46225.
- Velasco, J., Adrio, J.L., Moreno, M.A., Díez, B., Soler, G., Barredo, J.L.** 2000. Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*. *Nature Biotechnology* **18**: 857-861.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M.** 2008. *Trichoderma*-plant pathogen interactions in soil agro-economies. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1-10.
- Viterbo, A., Chet, I.** 2006. *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology* **74**: 249-258.
- Vizcaíno, J.A., González, F.J., Suarez, M.B., Redondo, J., Heinrich, J., Delgado-Jarana, J., Hermosa, R., Gutiérrez, S., Monte, E.,**

- Llobell, A., Rey, M.** 2006. Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics* **7**: 193.
- Vraný, J., Rasocho, V., Hausvater, E.** 1990. Inoculation of potatoes with microorganisms under field conditions. *Folia Microbiologica* **354**: 336-347.
- Weissman, K.J.** 2009. Introduction to polyketide biosynthesis. In: *Methods in Enzymology*, Vol **459**. Chapter 1. pp. 3-16.
- Whittaker R.H.** 1969. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* **163**: 150-160.
- Woo, S.L., Lorito, M.** 2006. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, ed. M Vurro, J Gressel, pp. 107-30. Amsterdam: Springer. 295 pp.
- Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M.** 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp. phytopathogenic fungi, and plants. The nature and application of biocontrol microbes II: *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **96**: 181-185.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I.** 1999. Induction of defense responses in cucumber plants *Cucumis sativus* L. by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 1061-1070.
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I.** 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* **235**: 235-242.
- Yildirim, E., Taylor, A.G., Spittler, T.D.** 2006. Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt

stress. *Scientia Horticulturae* **111**: 1-6.

Yu, D., Xu, F., Zeng, J., Zhan, J. 2012. Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *IUBMB Life* **64**: 285-295.W

**Lección Inaugural del Curso Académico
2017-2018
Campus de Ponferrada**



**universidad
de león**
■ Área de Publicaciones