

TITULO DE LA TESIS DOCTORAL

“Computational and molecular study of terpene synthase genes in *Trichoderma*” –
“Estudio computacional y molecular de los genes terpeno sintasa en *Trichoderma*”.

DOCTORANDA: Isabel Vicente Muñoz

DIRECTORES: Prof. Giovanni Vannacci y Prof. Enrique Monte Vázquez

CENTROS DE TRABAJO: Grupo de Patología Vegetal y Micología de la Universidad de Pisa (Italia) y Grupo de Fitopatología y Control Biológico del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Universidad de Salamanca (España).

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 15 de julio de 2020 en Pisa (Italia) de forma telemática.

RESUMEN

Los hongos del género *Trichoderma* son bien conocidos por su importancia en el manejo de enfermedades de las plantas de cultivo. Los efectos beneficiosos de estas especies están determinados por la gran variedad de metabolitos secundarios (MSs) que producen, los cuales juegan un papel fundamental en las interacciones que estos hongos establecen con otros organismos. A pesar del gran número de MSs aislados en *Trichoderma*, la mayor parte de los genes responsables de su biosíntesis no han sido caracterizados. En particular, los genes involucrados en la biosíntesis de compuestos terpenoides (terpeno sintasas – TSs) han recibido menos atención en comparación con otras familias génicas, a pesar de la importancia de estos compuestos en la ecología de *Trichoderma*.

Los objetivos de la presente tesis fueron i) obtener una visión general del potencial genómico para la biosíntesis de MSs en el género *Trichoderma*, mediante el estudio de genes y clústeres de genes pertenecientes a seis familias génicas y su distribución en 21 cepas de *Trichoderma*, agrupadas en cinco clados filogenéticos que muestran distintas habilidades de biocontrol y estilos de vida, ii) la caracterización *in silico* de los genes que codifican TSs en estas cepas para profundizar en la diversidad de estas enzimas y sus posibles productos metabólicos, y iii) realizar un estudio preliminar de expresión génica de los genes que codifican TSs en distintas condiciones ambientales y en interacción con otros organismos, para profundizar en la regulación de estos genes y su papel en la biología de estos hongos, utilizando la cepa T6085 de *Trichoderma gamsii* como modelo.

Los resultados de genómica comparativa mostraron que el potencial de biosíntesis de MSs está afectado por la distribución filogenética de las especies, y que aproximadamente la mitad de los genes clave necesarios de biosíntesis de MSs están incluidos en clústeres y participarían en vías metabólicas específicas. La biosíntesis de péptidos bioactivos contribuiría significativamente a generar metabolitos específicos en especies filogenéticamente cercanas, mientras que la biosíntesis de policétidos parece conferir habilidades metabólicas específicas en especies filogenéticamente más alejadas. Las diferencias en el potencial metabólico encontradas entre los distintos clados filogenéticos sugieren que las especies capaces de establecer interacciones más complejas con su ambiente, desde el punto de vista de la comunicación inter-organismo, han expandido su arsenal genómico para la producción de MSs. Se identificaron, por primera vez, genes involucrados en la biosíntesis de alcaloides, lo que indica que algunas especies habrían adquirido la capacidad de sintetizar estos compuestos, no detectados hasta ahora en los metabolomas de *Trichoderma*, y cuyas funciones ecológicas en estas especies están aún por determinar.

Los genomas de *Trichoderma* contienen una enorme cantidad de TSs, que supera al número encontrado en organismos considerados superproductores de MSs como *Aspergillus* spp. Se desarrolló un protocolo basado en la clusterización con TSs de función conocida y el estudio de motivos y dominios conservados que permitió la identificación de quince grupos de TSs, generando una visión del potencial biosintético de compuestos terpenoides en el género. Aunque las especies de *Trichoderma* poseen una capacidad similar para la biosíntesis de estos compuestos, han evolucionado acumulando TSs específicos de clado que han dado lugar a una variedad de quimiotipos adaptados para cubrir distintas demandas fisiológicas y ambientales. *Trichoderma* tiene una gran capacidad de biosíntesis de sesquiterpenos, y las sesquiterpeno sintasas son las enzimas que contribuyen mayoritariamente a generar terpenoides específicos de clado. En particular, se observó que las trichodieno sintasas (TRI5), involucradas en la biosíntesis de trichotecenos en las especies del clado Brevicomactum, se encuentran en las cepas de *T. gamsii* incluidas en un clúster de genes distinto al asociado con la producción de trichotecenos, lo que indica que estas enzimas podrían participar en distintas vías metabólicas en *Trichoderma*. Este hallazgo sugiere que TRI5 probablemente posee varias funciones biológicas en estas especies. Además, hemos visto que la biosíntesis de diterpenos es escasa en el género y está restringida a algunas

especies, mientras que la mayoría de las especies son capaces de producir diterpenos de indol, cuya biosíntesis no se ha descrito hasta ahora en *Trichoderma*.

Los estudios de expresión de nueve TSs de *T. gamsii* T6085, llevados a cabo en cultivos líquidos que simulaban diferentes situaciones de estrés, mostraron una regulación diferencial de estos genes, indicativo de diferentes funciones biológicas. En concreto, sugieren que la regulación de *tri5* en *T. gamsii* T6085 y en *T. brevicompactum* es diferente, indicando nuevamente una divergencia en la función biológica de este gen en distintas especies de *Trichoderma*. Además, la producción de diterpenos de indol podría ser un mecanismo de resistencia al estrés oxidativo en *T. gamsii* T6085. Dado que *T. gamsii* T6085 es utilizado como agente de biocontrol de la Fusariosis de la espiga de trigo se estudiaron los perfiles de expresión de los genes TSs en la interacción triple *T. gamsii* T6085 – *Fusarium graminearum* – espigas de trigo, con el objetivo de determinar si una modulación en la biosíntesis de terpenos por parte de *T. gamsii* podría ocurrir en este escenario. Los resultados indicaron que los genes TSs no parecen tener un papel importante en esta interacción. Aunque, de forma opuesta, los perfiles de expresión observados cuando el agente de biocontrol colonizaba las raíces del trigo indicaron una modulación en la biosíntesis de terpenoides durante esta interacción, sugiriendo que algunas TSs podrían tener un papel importante en el biocontrol de la Fusariosis de la espiga de trigo. En concreto, se observó una regulación diferencial de las sesquiterpeno sintasas y un incremento en la activación de la vía de biosíntesis de los triterpenos. Además, la fuerte sobrerregulación del gen *tri5* durante la colonización de las raíces sugiere nuevamente una función biológica desconocida de este gen en *T. gamsii* T6085, y la producción de diterpenos de indol podría estar reprimida en el hongo durante la colonización de las raíces de trigo.

La regulación diferencial observada en los genes que codifican TSs soporta la implicación de estas enzimas en distintas funciones biológicas, por lo que la diferenciación funcional de los genes integrantes de la familia de las TSs ha sido probablemente el mecanismo impulsor de la expansión de esta familia génica en el género *Trichoderma*.

Publicaciones derivadas de esta Tesis:

Zapparata A, Da Lio D, Somma S, Vicente Muñoz I, Malfatti L, Vannacci G, Moretti A, Baroncelli R, Sarrocco S (2017). Genome sequence of *Fusarium graminearum* ITEM 124 (ATCC 56091), a mycotoxigenic plant pathogen. *Genome Announcements* 5: e01209-17. doi:10.1128/genomeA.01209-17

Vicente Muñoz I, Sarrocco S, Malfatti L, Baroncelli R and Vannacci G (2019) CRISPR-Cas for Fungal Genome Editing: A New Tool for the Management of Plant Diseases. *Frontiers in Plant Science*. 10:135. doi: 10.3389/fpls.2019.00135

Vicente I, Baroncelli R, Morán-Diez ME, Bernardi R, Puntoni G, Hermosa R, Monte E, Vannacci G and Sarrocco S (2020) Combined comparative genomics and molecular biology approaches provide insights into the terpene synthases inventory in *Trichoderma*. (in preparation)

Sarrocco S, Esteban P, Vicente I, Bernardi R, Plainchamp T, Domenichini S, Puntoni G, Baroncelli R, Vannacci G and Dufresne M (2020) Straw competition and wheat root endophytism of *Trichoderma gamsii* T6085 as useful traits in the biocontrol of Fusarium Head Blight. *Phytopathology* (under revision)