



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

La acetiltransferasa de histonas TGF-1 regula el micoparasitismo y el metabolismo secundario en el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride*

Tesis que presenta

M.C. Elida Yazmín Gómez Rodríguez

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. J. Sergio Casas Flores

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P., Marzo 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “*La acetiltransferasa de histonas TGF-1 regula el micoparasitismo y el metabolismo secundario en el hongo filamentoso Trichoderma atroviride*” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Elida Yazmín Gómez Rodríguez** y aprobada el veintiocho de junio del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Códirectora de la tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores
Codirector de la tesis

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Alberto Flores Martínez
Miembro del Comité Tutorial

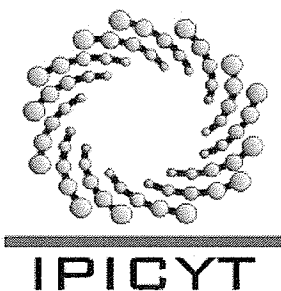


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Lina Raquel Riego Ruiz y J. Sergio Casas Flores.

La investigación descrita en esta tesis fue financiada con recursos otorgados al Dr. Sergio Casas Flores por el proyecto SEP-CONACYT CB-2013-01-220791.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 168956) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 099 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de junio del año 2018, se reunió a las 12:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|---|-------------------|---------------|
| Dr. Rubén Hipólito López Revilla | Presidente | IPICYT |
| Dr. Alberto Flores Martínez | Secretario | UG |
| Dr. Alejandro De Las Peñas Nava | Sinodal | IPICYT |
| Dr. J. Sergio Casas Flores | Sinodal | IPICYT |
| Dra. Lina Raquel Riego Ruiz | Sinodal | IPICYT |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Elida Yazmín Gómez Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

La acetiltransferasa de histonas TGF-1 regula el micoparasitismo y el metabolismo secundario en el hongo filamentosos Trichoderma atroviride

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Dr. J. Sergio Casas Flores

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 28 días del mes de junio de 2018.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



Dedicatorias

A **Dios** por guiar mi camino y bendecirme siempre, recordándome que sus planes son mejores que los míos.

A mis **Hijas**,
por ser la bendición, fortaleza y amor más grande que tengo.

A mi **Esposo**,
por apoyarme siempre, ser mi compañero de vida.

Agradecimientos

A mis **Padres**, por su apoyo y amor incondicional, por las palabras de aliento, por su ejemplo.

A mi **Hermana** y mi **Sobrina**, por su apoyo y amor, por cada momento de felicidad y compañía.

Al **CONACYT** y al **IPICYT** por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

Al **Dr. Sergio Casas Flores** y a la **Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**, por haberme aceptado en su grupo de trabajo para la realización de mi proyecto de tesis.

A mis compañeros de laboratorio **Gema, Edith, Tania, Macario, Miguel Silva, Miguel Salas, Claudia, Paco, Angel, Javier, Nohemí**, por su compañerismo y apoyo.

A **Isabel Isordia Jasso** y **Nicolás Hernández Gómez**, por su apoyo técnico.

Contenido

| | |
|---|-------------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos Institucionales | iii |
| Dedicatorias | iv |
| Agradecimientos | v |
| Contenido | vi |
| Lista de figuras | viii |
| Abreviaturas | ix |
| Resumen | x |
| Abstract | xi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Trichoderma atroviride como ACB | 2 |
| Producción de enzimas líticas | 3 |
| Producción de metabolitos secundarios | 5 |
| Estructura y función de la cromatina | 8 |
| Acetilación de las histonas | 8 |
| Desacetilación de histonas | 12 |
| Inhibidores de HATs y HDACs | 12 |
| JUSTIFICACIÓN | 14 |
| OBJETIVOS | 15 |
| Objetivo general | 15 |
| Objetivos específicos | 15 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento | 16 |
| Cultivos duales de las cepas silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ de <i>T. atroviride</i> vs <i>R. Solani</i> y otras especies de <i>Trichoderma</i> | 16 |
| Fotomicrografías de microcultivos de la interacción de las distintas cepas de <i>T. atroviride</i> silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ contra <i>R. solani</i> por microscopía electrónica de barrido (MEB). | 16 |
| Ensayo de antibiosis de las cepas silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> . | 17 |
| Cultivos de <i>T. atroviride</i> wt y $\Delta tgf-1$ con inducción del micelio de <i>R. solani</i> para los ensayos enzimáticos de quitinasa y proteasa. | 17 |
| Ensayo enzimático de Proteasa en <i>T. atroviride</i> . | 18 |
| Ensayo enzimático de Quitinasa en <i>T. atroviride</i> . | 18 |
| Expresión relativa de del gen <i>ech-42</i> , <i>prb-1</i> , <i>pbs-1</i> y <i>tps-1</i> en las cepas silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ de <i>T. atroviride</i> en confrontación con <i>R. solani</i> . | 19 |
| RESULTADOS | 20 |
| La Tricostatina A (TSA) no afecta el crecimiento de <i>T. atroviride</i> | 20 |
| La adición de TSA en el medio de crecimiento de <i>T. atroviride</i> aumenta su efecto inhibidor sobre el crecimiento de <i>R. solani</i> | 21 |

| | |
|--|-----------|
| La TSA afecta negativamente la expresión génica de <i>ech-42</i> , <i>prb-1</i> , <i>pbs-1</i> y <i>tps-1</i> en presencia de <i>R. solani</i> | 24 |
| La delección de <i>tgf-1</i> no afecta la capacidad micoparasítica de <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> | 27 |
| La cepa mutante Δ <i>tgf-1</i> tiene un efecto de inhibición mayor sobre el crecimiento de <i>R. solani</i> | 30 |
| La cepa mutante Δ <i>tgf-1</i> presenta una actividad quitinolítica constitutiva pero una actividad proteolítica inducible | 34 |
| TGF-1 y TSA regulan diferencialmente la expresión de <i>ech-42</i> , <i>prb-1</i> , <i>pbs-1</i> y <i>tps-1</i> | 35 |
| DISCUSIÓN | 38 |
| CONCLUSIONES | 46 |
| PERSPECTIVAS | 47 |
| ANEXOS | 48 |
| Anexo 1. Artículos Publicados | 48 |
| Anexo 2. Oligonucleótidos usados en este estudio | 50 |
| Anexo 3. Figuras suplementarias. | 51 |
| REFERENCIAS | 53 |

Lista de figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Proceso micoparasítico del hongo <i>T. atroviride</i> sobre <i>R. solani</i> . | 3 |
| Figura 2. Reacción reversible de acetilación/desacetilación. | 9 |
| Figura 3. La TSA A no afecta el sobrecrecimiento de <i>T. atroviride</i> sobre <i>R. solani</i> . | 21 |
| Figura 4. Ensayo de antibiosis de <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> . | 22 |
| Figura 5. Ensayo de antibiosis de <i>T. atroviride</i> contra <i>S. rolfsii</i> . | 23 |
| Figura 6. Ensayo de antibiosis de <i>T. atroviride</i> contra <i>B. cinerea</i> . | 23 |
| Figura 7. Ensayo de antibiosis de <i>T. atroviride</i> contra <i>F. oxysporum</i> . | 24 |
| Figura 8. La presencia de TSA y <i>R. solani</i> afecta negativamente la expresión de los genes <i>ech-42</i> , <i>prb-1</i> , <i>pbs-1</i> y <i>tps-1</i> en <i>T. atroviride</i> . | 26 |
| Figura 9. Morfología y desarrollo de las cepas de <i>T. atroviride</i> wt y Δ <i>tgf-1</i> . | 28 |
| Figura 10. Ensayos de cultivos duales de las cepas <i>T. atroviride</i> wt y Δ <i>tgf-1</i> contra <i>R. solani</i> . | 28 |
| Figura 11. La delección de <i>tgf-1</i> no afecta la capacidad micoparasítica de <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> . | 29 |
| Figura 12. Ensayo de antagonismo de la cepa mutante Δ <i>tgf-1</i> contra otras especies de <i>Trichoderma</i> . | 30 |
| Figura 13. Ensayo de antibiosis de la cepa Δ <i>tgf-1</i> de <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> . | 31 |
| Figura 14. Ensayo de antibiosis de la cepa Δ <i>tgf-1</i> de <i>T. atroviride</i> contra <i>S. rolfsii</i> . | 32 |
| Figura 15. Ensayo de antibiosis de la cepa Δ <i>tgf-1</i> de <i>T. atroviride</i> contra <i>B. cinerea</i> . | 33 |
| Figura 16. Ensayo de antibiosis de la cepa Δ <i>tgf-1</i> de <i>T. atroviride</i> contra <i>F. oxysporum</i> . | 33 |
| Figura 17. TGF-1 regula negativamente la actividad quitinolítica, pero no así la actividad proteolítica en <i>T. atroviride</i> . | 34 |
| Figura 18. TGF-1 y TSA regulan diferencialmente la expresión de los genes <i>ech-42</i> , <i>prb-1</i> , <i>pbs-1</i> y <i>tps-1</i> en <i>T. atroviride</i> . | 36 |

Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| HDAC | Desacetilasa de histonas (H istone D e A Cetylase) |
| HAT | Acetiltransferasa de histonas (H istone A cetyl T ransferase) |
| ech-42 | Gen que codifica para la endoquitinasa de 42 kDa |
| prb-1 | Gen que codifica para una proteinasa básica |
| pbs-1 | Gen que codifica para una peptaibol sintasa |
| tps-1 | Gen que codifica para una terpeno sintasa |
| act | Gen que codifica para actina |
| tgf-1 | Gen que codifica para una acetil transferasa de histonas |
| Ta | <i>Trichoderma atroviride</i> (<i>T. atroviride</i>) |
| wt | Cepa silvestre de <i>T. atroviride</i> |
| Δtgf-1 | Cepa mutante del gen <i>tgf-1</i> en <i>T. atroviride</i> |
| Rs | <i>Rhizoctonia solani</i> (<i>R. solani</i>) |
| Tv | <i>Trichoderma virens</i> (<i>T. virens</i>) |
| Tc | <i>Trichoderma citrinoviride</i> (<i>T. citrinoviride</i>) |
| Th | <i>Trichoderma harzianum</i> (<i>T. harzianum</i>) |
| Bc | <i>Botrytis cinerea</i> (<i>B. cinerea</i>) |
| Sr | <i>Sclerotium rolfsii</i> (<i>S. rolfsii</i>) |
| Fo | <i>Fusarium oxysporum</i> (<i>F. oxysporum</i>) |

Resumen

La acetiltransferasa de histonas TGF-1 regula el micoparasitismo y el metabolismo secundario en el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride*

El género *Trichoderma* es usado como agente de biocontrol contra una gran variedad de hongos fitopatógenos y oomicetos. *Trichoderma* spp. antagoniza a los fitopatógenos a través de la liberación de enzimas líticas, antibiosis y micoparasitismo. En este trabajo analizamos el papel de la acetilación de histonas sobre el micoparasitismo y la antibiosis de *Trichoderma atroviride* contra el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Utilizamos la tricostatina A (TSA), un inhibidor de desacetilasas de histonas, para promover la acetilación de histonas en *T. atroviride*, evaluar su efecto sobre el micoparasitismo y la síntesis de compuestos antimicrobianos contra *R. solani*, así como la transcripción de genes relacionados con el micoparasitismo (*prb-1* y *ech-42*) y la antibiosis (*pbs-1* y *tps-1*). La TSA afectó ligeramente el crecimiento de *T. atroviride* y *R. solani*, pero no el crecimiento del micoparásito sobre *R. solani* y produjo un aumento en la síntesis de compuestos antimicrobianos por *T. atroviride*. Además, el análisis de expresión de *prb-1*, *ech-42*, *pbs-1* y *tps-1* mostró que estos genes son regulados negativamente por la presencia de TSA y *R. solani*. Por otro lado, la delección del gen *tgf-1* de *T. atroviride*, que codifica la histona acetiltransferasa TGF-1 ortóloga a Gcn5p de *Saccharomyces cerevisiae* provocó un crecimiento lento, hifas más delgadas y menos ramificadas que las del tipo silvestre pero no afectó la capacidad para enrollar las hifas de *R. solani*. *T. atroviride* Δ *tgf-1* fue incapaz de sobrepasar el crecimiento de *R. solani* pero tuvo mayor capacidad para inhibir su crecimiento. La expresión de *prb-1*, *ech-42*, *pbs-1* y *tps-1* en Δ *tgf-1* disminuyó en presencia y ausencia de *R. solani*. Además, la cepa de *T. atroviride* Δ *tgf-1* confrontada consigo misma y con la cepa silvestre perdió la manera de identificarse con la cepa silvestre y reconocerse a sí misma, ya que mostró una marcada zona de lisis; también perdió la capacidad de reconocer, defenderse o antagonizar a otras especies de *Trichoderma*. Estos resultados indican que la acetilación de las histonas desempeña un papel crucial en el micoparasitismo, la competencia, el metabolismo secundario y la regulación génica en *T. atroviride*.

Palabras clave: GCN5, acetilación de histonas, antibiosis, micoparasitismo, metabolismo secundario, Tricostatina A.

Abstract

Histone acetyltransferase TGF-1 regulates *Trichoderma atroviride* secondary metabolism and mycoparasitism

The genus *Trichoderma* is used as a biocontrol agent against a large number of airborne and soilborne phytopathogens. *Trichoderma* spp. antagonize phytopathogens through the release of lytic enzymes, antibiosis and mycoparasitism. In this study we analyzed the role of histone acetylation on mycoparasitism and antibiosis of *Trichoderma atroviride* against the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. We used Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, to promote histone acetylation in *T. atroviride*, to assess its role in mycoparasitism and synthesis of antimicrobial compounds against *R. solani*, as well as in the transcription of genes related to mycoparasitism (*prb-1* and *ech-42*) and antibiosis (*pbs-1* and *tps-1*). TSA slightly affected *T. atroviride* and *R. solani* growth, but not the ability of the mycoparasite to grow over *R. solani*. Application of TSA to the medium induced the synthesis of antimicrobial compounds by *T. atroviride*. Additionally, *prb-1*, *ech-42*, *pbs-1* and *tps-1* were negatively regulated by TSA and *R. solani*. On the other hand, deletion of the *T. atroviride* *tgf-1* gene encoding the histone acetyltransferase TGF-1 orthologous to Gcn5p from *Saccharomyces cerevisiae* caused a decrease in growth rate, thinner and less branched hyphae but did not affect the ability to coil *R. solani* hyphae. *T. atroviride* Δ *tgf-1* was incapable to overgrow *R. solani* but enhanced the ability to inhibit its growth. Expression of *prb-1*, *ech-42*, *pbs-1* and *tps-1* decreased in the presence and absence of *R. solani*. Besides, the *T. atroviride* Δ *tgf-1* strain co-cultured with the wild type strain or herself lost its ability to identify the wild-type strain and to recognize itself and also lost the ability to recognize, defend itself or antagonize other species of *Trichoderma*. These results indicate that histone acetylation plays a crucial role in *T. atroviride* mycoparasitism, competence, secondary metabolism and gene regulation.

Keywords: GCN5, histone acetylation, antibiosis, mycoparasitism, secondary metabolism, Trichostatin A.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha buscado mejorar la vida humana en muchos aspectos; entre ellos, en la agricultura se han desarrollado nuevas tecnologías que sean ambiental y económicamente amigables. En el caso del manejo de las enfermedades de plantas producidas por organismos fitopatógenos se han buscado alternativas como es el uso de agentes de control biológico (ACB) (Naheer *et al.*, 2014; Schmoll *et al.*, 2014). Actualmente, se conocen varios ACB por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma* (e.g. *T. virens*, *T. atroviride*), *Verticillium biguttatum* y *Pythium oligandrum* entre otros (Koumoutsis *et al.*, 2004; Mavrodi *et al.*, 2002; Atehnkeng *et al.*, 2008; Gilardi *et al.*, 2008; Daguerre *et al.*, 2014).

Entre los ACB, el género *Trichoderma* es uno de los más versátiles y más usados. Las especies del género *Trichoderma* son hongos típicamente cosmopolitas, ubicuos en ecosistemas terrestres, saprófitos que se alimentan de madera en descomposición y restos vegetales (Kubicek *et al.*, 2008; Druzhinina *et al.*, 2011). También son conocidos como productores de enzimas, proteínas recombinantes (Lorito *et al.*, 2010) y metabolitos secundarios a nivel industrial; y son utilizados exitosamente para combatir hongos fitopatógenos (Desai *et al.*, 2002; Harman, 2006). Dentro del género *Trichoderma* las especies que se han usado como ACB son *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens* y *T. asperellum* (Grinyer *et al.*, 2005; Marra *et al.*, 2006; Seidl *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2017).

Un análisis de la secuencia del genoma de tres especies de *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei*) encontró que el micoparasitismo es el estilo de vida ancestral del género *Trichoderma* (Kubicek *et al.*, 2011). Así mismo, un análisis de estas tres especies de *Trichoderma* contra *R. solani*; encontró que el modo de acción antagónico de *T. virens* es mediante una interacción tipo depredación, en tanto que *T. atroviride* expresa una interacción de parasitismo y

T. reesei muestra una interacción neutral con señales débiles de micoparasitismo (Atanasova *et al.*, 2013).

Trichoderma atroviride como ACB

T. atroviride es un hongo fungicida con un amplio espectro de acción. Funciona en el suelo contra agentes que provocan pudriciones de raíces como oomicetos de los géneros *Pythium*, *Phytophthora* y hongos de los géneros *Rhizoctonia* y *Fusarium*; o bien, contra enfermedades de órganos aéreos como las causadas por hongos de los géneros *Botrytis* o *Stereum* (Ogoshi, 1987; Scherm *et al.*, 2009; Omann y Zeilinger, 2010).

El mecanismo usado por *T. atroviride* para antagonizar hongos fitopatógenos incluye cuatro modos de acción: 1) la competencia por espacio y nutrientes (Elad, 1996; Howell, 2003); 2) la antibiosis (Kubicek *et al.*, 2001; Viterbo *et al.*, 2002; Chen, *et al.*, 2009); 3) el micoparasitismo (Mukherjee *et al.*, 2008; Daguerre *et al.*, 2014; Vos *et al.*, 2015), y 4) la estimulación de los sistemas de defensa de la planta (Hermosa *et al.*, 2012; Shores *et al.*, 2010; Salas-Marina *et al.*, 2011, 2015).

Durante el micoparasitismo *T. atroviride* dirige su crecimiento mediante compuestos producidos por el huésped (quimiotropismo) (Chet *et al.*, 1981), realiza un reconocimiento mediado por lectinas (Inbar y Chet, 1992), se adhiere sobre la pared del patógeno por medio de la formación de estructuras especializadas tipo apresorio, lleva a cabo la lisis de la pared celular del huésped por medio de enzimas líticas como proteasas, quitinasas, glucanasas y lipasas (Lorito *et al.*, 1996; Schuster y Schmoll, 2010) y metabolitos secundarios como peptaiboles y compuestos con actividad antibiótica (Reino *et al.*, 2008; Mathivanan *et al.*, 2008); para finalmente realizar la asimilación del contenido celular del huésped (Steyaert *et al.*, 2003; Benítez *et al.*, 2004) (Figura 1).

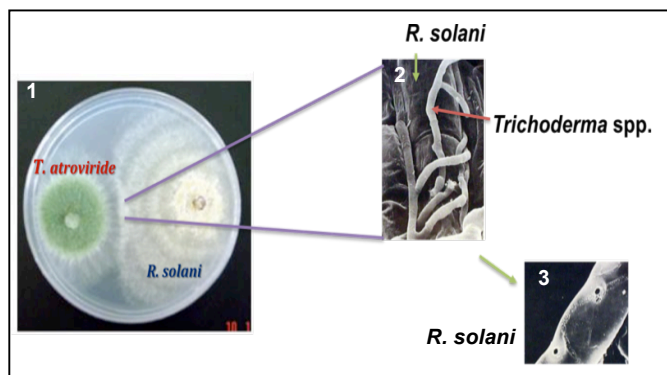


Figura 1. Proceso micoparasítico del hongo *T. atroviride* sobre *R. solani*.

1) Muestra la confrontación de los dos hongos. 2) Muestra un acercamiento en el área de interacción por microscopía, donde se observa la manera en que *T. atroviride* enrolla la hifa de *R. solani*. 3) una vez que se retiran las hifas de *T. atroviride*, se observan los orificios realizados por *T. atroviride* sobre la hifa de *R. solani*, a través de la acción de enzimas líticas producidas por *T. atroviride* (Modificado de Casas-Flores, 2008).

El modelo micoparásito-huésped que se tiene a la fecha, sugiere que la producción de enzimas líticas (independiente del contacto entre los hongos) y la formación de estructuras de infección son activadas por la unión de una molécula difusible producida por el huésped a los receptores del parásito (e.g. productos de degradación de su pared celular, proteínas o toxinas) (Cortes *et al.*, 1998; Kullnig *et al.*, 2000; Zeilinger y Omann, 2007; Brunner *et al.*, 2008). Woo *et al.*, (2006), identificaron que las moléculas difusibles son de bajo peso molecular derivadas del hongo huésped y están hechas de pequeños oligosacáridos (e.g., un manoacetilquitobiosa unida a dos unidades de celobiosa) unidos a un aminoácido (valina u ornitina). Por esto, se ha observado que la señalización y respuesta micoparasítica depende del huésped (Daguerre *et al.*, 2014).

Producción de enzimas líticas

Los ACB incluido *T. atroviride* llevan a cabo la producción de una amplia variedad de enzimas líticas; de éstas, el uso de quitinasas, glucanasas y proteasas es casi universal (Sanz *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2015; Vos *et al.*, 2015). Estas enzimas líticas son usualmente extracelulares, de bajo peso molecular y altamente estables. Estas enzimas son producidas en múltiples formas o isoenzimas que difieren en tamaño, regulación y habilidad para degradar la pared celular (Koga *et*

al., 1999; Daguerre *et al.*, 2014). En *Trichoderma*, el sistema quitinolítico puede ser muy robusto. Por ejemplo, en *T. reesei* se identificaron 38 enzimas, en *T. virens* 50 enzimas y *T. atroviride* 52 enzimas, todas ellas comprendidas en 6 familias de glicosil hidrolasas (Kubicek *et al.*, 2011). Varios de los componentes de este sistema quitinolítico son mutuamente complementarias en mecanismo de acción; pero se requiere que el sistema esté completo para obtener una máxima eficacia (Hasan *et al.*, 2014).

Las quitinasas son una herramienta efectiva para la completa degradación del micelio o conidias del hongo fitopatógeno. Sin embargo, las proteasas extracelulares de *Trichoderma* spp. participan de manera importante en la lisis de la pared celular del hongo fitopatógeno, porque la quitina y/o fibras de β -glucanos están embebidas en una matriz de proteínas. Algunas de las proteasas secretadas también pueden estar involucradas en la inactivación de enzimas extracelulares del hongo fitopatógeno (Elad y Kapat, 1999). En *T. atroviride* se identificaron tres tipos de proteasas, una similar a serin-proteasas vacuolares con 6 isoformas, una proteasa A vacuolar y una proteasa del tipo tripsina (Grinyer *et al.*, 2005).

De las enzimas líticas involucradas en el proceso de micoparasitismo en *T. atroviride*, se ha estudiado a la proteasa PRB-1 y a la endoquitinasa ECH-42. Geremia *et al.*, (1993) identificaron el gen de una proteasa básica (*prb-1*), que se indujo por micelio esterilizado por presión/vapor de agua, paredes celulares del hongo fitopatógeno o quitina. Esta proteína se caracterizó de acuerdo con el residuo catalítico de su sitio activo como serin-proteasa, del tipo subtilisina de 31 kDa (Page y Di Cera, 2008).

Carsolio *et al.*, (1994) caracterizaron un gen (*ech-42*) que codifica para una endoquitinasa de 42 kDa, que se induce por quitina y contacto directo con el micelio de *R. solani*. ECH-42, de acuerdo con la similitud de su secuencia de aminoácidos, pertenece a la familia 18 de las glicosil hidrolasas conocidas como

quitolectinas (Adams, 2004; Duo-Chuan, 2006; Funkhouser y Aronson, 2007). Las cepas sobreexpresantes de los genes *prb-1* y *ech-42* demostraron proveer una mayor protección a las plantas contra hongos patógenos (Carsolio *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 1997).

Producción de metabolitos secundarios

Además de la producción de enzimas líticas, los hongos del género *Trichoderma* producen una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad antibiótica implicados en el control biológico de fitopatógenos (Reino *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2014). Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que funcionan como señales químicas para la comunicación entre células de la misma especie o de especies diferentes (Netzker *et al.*, 2015; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016). Además, son usualmente producidos como familias de compuestos relacionados y los genes que codifican para las proteínas involucradas en el metabolismo secundario, generalmente se encuentran en clústers localizados en regiones silenciadas transcripcionalmente (Keller *et al.*, 2005; Brakhage, 2013), generalmente en regiones subteloméricas (Merrick y Duraisingh, 2006; Andersen *et al.*, 2013; Zeilinger *et al.*, 2016).

Los metabolitos con actividad antibiótica en *Trichoderma* pueden ser clasificados en dos tipos: 1) los metabolitos volátiles y de bajo peso molecular que incluyen: compuestos aromáticos simples, algunos policétidos tales como las pironas y los butenólidos, los terpenos volátiles y los metabolitos isociano. Y 2) los metabolitos polares de alto peso molecular como los peptaiboles (Cardoza *et al.*, 2005; Kubicek y Harman, 1998). Dentro de los metabolitos secundarios volátiles de bajo peso molecular, la 6-pentil- α -pirona (6PP) es el antifúngico más importante y mejor caracterizado (Vinale *et al.*, 2006), y confiere el característico olor a coco de *Trichoderma atroviride* (Dodd *et al.*, 2003). Un ejemplo en *T. virens*, es una mutante deficiente en el metabolismo secundario, la cual no produjo viridina ni viridiol. Al comparar la secuencia de los genes de esta mutante, se observó que se encuentran en un clúster similar a aquellos involucrados en el metabolismo

secundario de otros hongos como *Gibberella fujikuroi*, *Aspergillus oryzae* y *Fusarium graminearum*. Este clúster incluye la secuencia de tres genes de citocromo P450 y el gen de una terpeno ciclasa. La organización parcial de este cluster, se parece al cluster para la biosíntesis de giberelinas. Por lo que propusieron que este cluster está asociado con la producción de terpenos, viridina/viridiol (Mukherjee *et al.*, 2006).

Los peptaiboles son péptidos lineales con propiedades antibacteriales, antifúngicas y ocasionalmente antivirales (Mathivanan *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2011). Contienen de 5-20 aminoácidos y característicamente tienen un grupo N-terminal acetilado, un C-terminal reducido en alcoholes, tales como fenilalaninol o leucinol. Los peptaiboles contienen amino e imino ácidos inusuales incluyendo el ácido α -aminoisobutírico, la isovalina, la β -alanina y la hidroxiprolina. Actualmente se conocen más de 300 estructuras de peptaiboles y están agrupados en 9 subfamilias (Whitmore y Wallace, 2004; Stoppacher *et al.*, 2007). El tipo de familia de peptaiboles producido en *Trichoderma* es específico de especie (Degenkolb *et al.*, 2006). En *T. harzianum* se ha reportado la producción de diferentes familias de peptaiboles como, harzianinas, trichokinidinas, trichorozinas y trichozianinas (Szekeres *et al.*, 2005). En *T. atroviride* se han descrito las familias de peptaiboles atroviridinas y trichorzianinas (Neuhof *et al.*, 2007).

Una característica común de los peptaiboles es su biosíntesis por las péptido sintetetasas no-ribosomales (NRPS, de sus siglas en inglés) (Degenkolb *et al.*, 2003). Las NRPS tienen una estructura modular básica que contiene los dominios: A-activación (realiza la selección de los aminoácidos y adenilación), T o PCP-dominio (portador del grupo peptidil) y C-condensación (formación del enlace peptídico) (Prieto, 2016; Miller y Gulick, 2016). La presencia al menos del dominio A en cada enzima NPRS facilita su identificación en los genomas fúngicos (Soukup *et al.*, 2016).

Se observó que una PPTasa (enzima 4-fosfopanteteinil transferasa) específica es co-expresada con el clúster de NRPS (Beld *et al.*, 2014). Por ejemplo, una mutante $\Delta ppt1$ de *T. virens*, gen que codifica para una PPTasa, produjo conidias no pigmentadas, fue incapaz de sintetizar peptaiboles y de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y oomycetes *in vitro* tales como *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium rolfsii* y *R. solani* (Velázquez-Robledo *et al.*, 2011). Bansal y Mukherjee (2016), hicieron el análisis del genoma de tres especies de *Trichoderma* e identificaron en *T. reesei* un clúster de NRPS, en *T. virens* ocho clústers de NRPS y en *T. atroviride* cuatro clústers de NRPS. Incluso se ha observado, que una sola NRPS puede producir uno o más tipos de peptaiboles (Wei *et al.*, 2005; Viterbo *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2011).

Komon-Zelazowska *et al.*, (2007) presentaron la estructura de la peptaibol sintetasa (PBS1) de *T. atroviride*, la cual consiste de 19 módulos de péptido sintetasa típicos con el dominio adicional modificador de los extremos amino (N-) y carboxi (C-) -terminal. Se ha propuesto que la actividad biológica de los peptaiboles “largos” (>16 residuos) está ligada a su potencial para asociarse y formar canales iónicos en la membrana- bicapa lipídica, donde los peptaiboles “cortos” forman diferentes tipos de agregados (Boheim, 1974; Chugh y Wallace, 2001; Schuhmacher *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que la acción conjunta y sincronizada de las enzimas hidrolíticas y los antibióticos, potencian la actividad antagónica de *T. atroviride* sobre su huésped (Keswani *et al.*, 2014). La digestión enzimática de la pared celular por las enzimas hidrolíticas, facilitan la penetración de los antibióticos, permitiendo una concentración local mayor en la membrana. A su vez, la penetración de peptaiboles en la membrana-bicapa lipídica reduce la habilidad del huésped para reparar la pared celular inhibiendo la síntesis de quitina y β -glucanos (Lorito *et al.*, 1996; Schirmböck *et al.*, 1994).

Estructura y función de la cromatina

El ADN se encuentra organizado en una estructura denominada cromatina. La unidad fundamental de esta estructura es el nucleosoma, el cual está compuesto por un octámero de histonas H2A, H2B, H3 y H4, dos de cada una y de 146 pb de ADN enrollado alrededor de estas. Estas histonas son proteínas básicas, altamente conservadas, que consisten de un dominio globular y una cola N-terminal flexible (Grunstein, 1997). Los extremos N-terminal de las histonas son susceptibles a modificaciones químicas postraduccionales. Estas modificaciones afectan la estructura de la cromatina permitiendo un estado relajado (Eucromatina) asociado con la activación de la transcripción génica, o bien a un estado condensado (Heterocromatina) que se relaciona con la represión transcripcional (He y Lehming, 2003). La acetilación de las histonas, permiten el incremento de la accesibilidad del ADN a la maquinaria transcripcional (Imohf, 2003; Girdwood *et al.*, 2003).

Acetilación de las histonas

La acetilación fue descrita por primera vez en 1963 (Phillips, 1963) y las proteínas que participan en este proceso, son las acetiltransferasas (HAT, por sus siglas en inglés Histone Acetyl Transferase) y desacetilasas de histonas (HDAC, por sus siglas en inglés Histone DeACetylase). Donde las HATs y las HDACs presentan un acción directa sobre la cromatina y la regulación transcripcional (Struhl, 1998; Brosch *et al.*, 2008). La acetilación no es exclusiva de las histonas, aunque muchas proteínas acetiladas parecen ser nucleares y estar asociadas con la regulación de la transcripción; también se ha reportado que hay acetilación/desacetilación de proteínas en el citoplasma y en la mitocondria; lo que sugiere una distribución más amplia de lo que se había anticipado (North *et al.*, 2003; Ledent y Vervoort, 2006). Por otro lado, se ha observado que la actividad de las HATs y HDACs, es regulada a través de fosforilación. Pero también pueden ser reguladas a través de otras modificaciones, por ejemplo, la

HDAC4 requiere ser sumoilada para su completa actividad (Legube y Trouche, 2003).

Las HATs catalizan la transferencia de un grupo acetilo del acetil-CoA al grupo ϵ -amino de los residuos de lisinas en el extremo N-terminal de las histonas; esto relaja la asociación del ADN y el octámero de histonas, y permite que la maquinaria de transcripción tenga accesible el ADN. Mientras que las HDACs realizan la función contraria, remueven el grupo acetilo de las lisinas acetiladas en los extremos N-terminales de las histonas para compactar los nucleosomas, silenciar la cromatina y evitar la transcripción de los genes (Figura 2) (Cuperlovic-Culf y Culf, 2014).

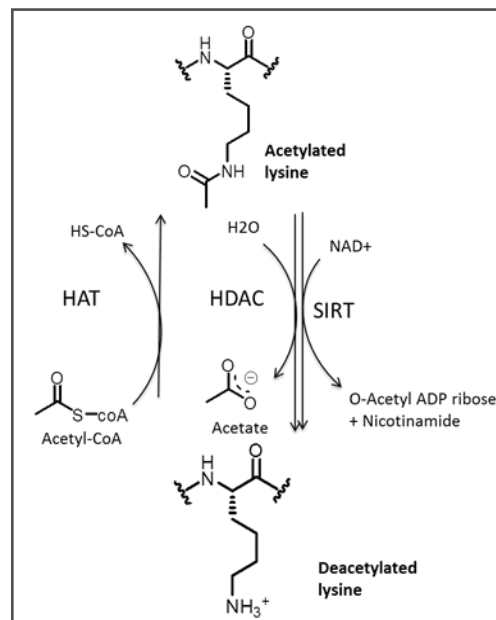


Figura 2. Reacción reversible de acetilación/desacetilación.

La lisina está cargada positivamente en su cadena lateral situada en el carbono ϵ (épsilon-amino). Este grupo amino puede ser acetilado por la HAT. Esta reacción puede ser revertida por la actividad de HDAC. La presencia de la carga positiva sobre la lisina de las colas de las histonas aumenta el potencial de interacciones electrostáticas con la carga negativa del fosfato de la columna vertebral del ADN. Tomado de Cuperlovic-culf y Culf, 2014.

Las HATs se clasifican en dos grupos: en la familia HAT "A" están aquellas acetilasas que se encuentran en el núcleo y que transfieren el grupo acetilo a las

histonas después de ensamblarse en los nucleosomas. A su vez, estas pueden ser subdivididas en tres subclases: GNAT (N-acetyltransferase family related Gcn5), MYST y otras (HAT1, Nut1). En la familia HAT “B” se encuentran las acetilasas que actúan en el citoplasma y que transfieren el grupo acetilo del Acetil-CoA a un grupo -NH₂ de histonas libres antes de ser depositadas en el ADN (Grunstein, 1997; Peserico y Simone, 2011; Furdas *et al.*, 2012).

Por otro lado, las enzimas HDACs están clasificadas como: A) HDACs clásicas que comprenden 3 clases, I) las relacionadas a RPD3, II) las relacionadas a HDA1, y III) las HD2-like. Y B) las sirtuinas, relacionadas a SIR2 (Graessle *et al.*, 2001). La clase I de HDACs se encuentra casi exclusivamente en el núcleo, mientras que las HDACs de clase II son capaces de salir y entrar al núcleo en respuesta a ciertas señales celulares. Las HDACs clásicas participan removiendo el grupo acetilo de las histonas por un sistema de liberación de carga. Un componente esencial de este sistema es la presencia del ión Zn²⁺ (Ruijter *et al.*, 2003). Por otro lado, las sirtuinas se encuentran en una gran variedad de compartimentos subcelulares (e.g. núcleo, citoplasma, mitocondria) y para deacetilar las acetil-lisinas requieren del cofactor NAD⁺ (Trojer *et al.*, 2003; North y Verdin, 2004).

Se ha reportado que las HATs y las HDACs (co-activadores y co-represores, respectivamente) se encuentran en grandes complejos de 10 a 20 subunidades y que algunos de los componentes son compartidos entre diferentes complejos (Shahbazian y Grunstein, 2007). Incluso, se ha encontrado que algunos de los complejos pueden contener ambas actividades de HAT y HDAC (Johnsson *et al.*, 2009).

Un ejemplo de estos grandes complejos, es el complejo Ada2/Ada3/Gcn5 en *S. cerevisiae*, el cual es suficiente para una actividad HAT nucleosomal robusta (Spröte *et al.*, 2008). El complejo SAGA/ADA (Spt/Ada/Gcn5 Acetyltransferase) tiene un papel importante en la inducción específica de clústers de metabolismo

secundario, como esterigmatocistina, penicilina y terrequinonas en *Aspergillus nidulans*. Se ha observado por ejemplo, que el incremento en la acetilación de la H3K14 es un fenómeno global de todo el genoma; pero el incremento en la acetilación de la H3K9, es observada solo en los clústers génicos de metabolismo secundario (Nützmann *et al.*, 2013).

Kleff *et al.* (1995), identificaron y clonaron la primer acetiltransferasa de histonas, la HAT1 de *Sacharomyces cerevisiae*. Sin embargo, las mutantes *hat1* no tuvieron defectos obvios en el crecimiento o fenotipo, solo la carencia de la actividad enzimática. Un poco después, Brownell *et al.* (1996) identificaron una proteína de 55 KDa en *Tetrahymena thermophila*, la cual fue ortóloga de Gcn5 (General Control Nonderepressible-5) de *S. cerevisiae*. La HAT Gcn5 es la mejor estudiada y es miembro fundador de la familia GNAT. Se sabe que Gcn5 acetila preferencialmente las lisinas 9, 14, 18 y 23 de la histona H3 (Kuo *et al.*, 1998; Strahl y Allis, 2000); aunque también acetila las lisinas 8 y 16 de la histona H4 (Trievel *et al.*, 1999; Islam *et al.*, 2011; Rosaleny *et al.*, 2007).

Por ejemplo, en hongos filamentosos se han identificado proteínas ortólogas a Gcn5 como GcnE en *A. nidulans*, que regula el clúster para la biosíntesis de penicilina (Nützmann *et al.*, 2011). O el gen *Umgn5* en *Ustilago maydis*, el cual es ortólogo a *GCN5* en *S. cerevisiae*. Las cepas mutantes en este gen, no fueron virulentas a plantas de maíz (González-Prieto *et al.*, 2014; Martínez-Soto *et al.*, 2015). Otro ejemplo es el gen *NGF-1*, homólogo a *GCN5* de *S. cerevisiae* en *Neurospora crassa*, cuyo producto es responsable de la acetilación inducida por luz (Brosch *et al.*, 2008). El ortólogo de *S. cerevisiae* en *T. reesei* es el gen *TrGcn5*, el cual tiene un papel crítico en el crecimiento filamentoso, la morfogénesis y en la activación transcripcional de genes específicos, como el gen que codifica para la celulasa (Xin *et al.*, 2013).

Desacetilación de histonas

Por otro lado, Vidal *et al.* (1991) identificaron y describieron a Rpd3 en *S. cerevisiae*, pero fue Taunton *et al.* (1996), quienes relacionaron a Rpd3 con la actividad HDAC. Posteriormente, la histona deacetilasa 1 (HDAC1), fue clonada como el ortólogo humano de Rpd3 (Bjerling *et al.*, 2002; Verdin y Ott, 2015). En general, las HDACs no parecen tener mucha especificidad por un grupo acetilo en particular; pero algunas de las HDACs de *S. cerevisiae*, tienen especificidad por una histona en particular: Hda1 por H3 y H2B, Hos2 por H3 y H4, y Sir2 por H4K16ac (Kouzarides, 2007).

En *A. nidulans* RpdA, es una HDAC clase I y ortóloga del represor global Rpd3 de *S. cerevisiae*. RpdA es necesaria para el crecimiento, conidiación y regulación génica. La carencia de Rpd3 permite un aumento en la acetilación de las lisinas 5 y 12 de la H4, y la lisina 18 de la H3 en los genes desreprimidos (Robyr *et al.*, 2002; Tribus *et al.*, 2010). La delección de hdaA (histona desacetilasa 1), la cual es una HDAC clase II en *A. nidulans* causa desregulación de clústers de genes que están localizados cerca de los telómeros, produciendo una expresión aumentada y precoz de los genes de esterigmatocistina y penicilina (Shwab *et al.*, 2007). La ausencia de RpdA en *A. nidulans* y *N. crassa* es letal (Smith *et al.*, 2010). En *Aspergillus fumigatus*, HdaA también participa en la regulación del metabolismo secundario (Lee *et al.*, 2009).

Inhibidores de HATs y HDACs

El empleo de inhibidores de HDACs en hongos, ha permitido la sobreexpresión de muchos metabolitos secundarios, sugiriendo que las HDACs median la represión de ciertos clústers de genes de metabolitos secundarios (Shwab *et al.*, 2007; Wu y Yu, 2015). El uso de inhibidores de las HDACs, permite incrementar el número de histonas acetiladas, y suponer como consecuencia la expresión masiva de genes (Van Lint *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha observado que la expresión de

genes parece ser más específica de lo esperado y afecta solamente al 2% de ellos (Pakneshan *et al.*, 2004; Marks *et al.*, 2000).

Los inhibidores de HDACs funcionan bloqueando el acceso del sitio activo de las HDAC de manera reversible o irreversible (Ruijter *et al.*, 2003). Entre los inhibidores de HDACs se encuentra la Tricostatina A (TSA), que pertenece al grupo de los ácidos hidroxámicos y fue aislado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (Graessle *et al.*, 2001). Este compuesto inhibe a las HDACs clase I y II de manera reversible, y es efectivo en concentraciones nanomolares (Neissa y Guerrero, 2004; Szyf, 2009; Lamothe *et al.*, 2015). Este inhibidor actúa al desplazar el ión zinc y convierte en disfuncional el sistema de liberación de carga de las HDACs (Yoshida *et al.*, 1995; Seto y Yoshida, 2014; Filippakopoulos *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Las especies de *Trichoderma* están entre los ACB más estudiados y actualmente son comercializados exitosamente como biopesticidas y biofertilizadores, por lo que existe gran interés por dilucidar el proceso de micoparasitismo. Se desconoce la manera en la que participan las modificaciones postraduccionales de las histonas regulando la actividad transcripcional en dicho proceso. En este trabajo se analizó el papel de la acetilación/desacetilación en el proceso micoparasítico y antagónico de *T. atroviride* contra el fitopatógeno *R. solani* mediante el uso del TSA para inhibir las HDACs clase I y II, así como la participación de la HAT TGF-1 de *T. atroviride* codificada por el gen ortólogo a Gcn5 de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el papel de la acetilación, mediante el efecto del TSA sobre las HDACs y la participación de la HAT TGF-1 en el micoparasitismo y el metabolismo secundario en *T. atroviride*, durante su interacción con el hongo fitopatógeno *R. solani*.

Objetivos específicos

Analizar el proceso micoparasítico y de antibiosis de *T. atroviride* contra *R. solani* en presencia de TSA.

Analizar el papel de TSA en la expresión de genes relacionados a micoparasitismo (*ech-42* y *prb-1*) y genes relacionados a antibiosis (*pbs-1* y *tps-1*).

Determinar la capacidad antagónica de la cepa mutante Δ *tgf-1* de *T. atroviride* contra *R. solani*.

Analizar la interacción de la cepa mutante Δ *tgf-1* de *T. atroviride* con otras cepas de *Trichoderma*.

Analizar la capacidad antagónica de la cepa mutante Δ *tgf-1* de *T. atroviride* contra *R. solani* en presencia de TSA.

Analizar el papel de TGF-1 y TSA en la expresión de genes relacionados a micoparasitismo (*ech-42* y *prb-1*) y genes relacionados a antibiosis (*pbs-1* y *tps-1*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las cepas fúngicas fueron crecidas en los medios de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) o en Papa Dextrosa Caldo (PDB) (Difco™, BD Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), y cuando fue necesario se agregó Tricostatina A (TSA) 300 nM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Las distintas cepas se incubaron a 28°C por los tiempos indicados en cada experimento.

Cultivos duales de las cepas silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ de *T. atroviride* vs *R. Solani* y otras especies de *Trichoderma*

Se prepararon cajas de petri con PDA (Difco) en presencia o ausencia de Tricostatina A (TSA) 300nM (Sigma-Aldrich). En un extremo de las cajas de Petri sobre el medio de cultivo se inocularon las cepas de *T. atroviride* silvestre o mutante y en el extremo opuesto a la cepa de *R. solani* y se incubaron a 28°C por 36, 48, 60, 72 y 96 h, y se fotografiaron. Los cultivos se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes. También se prepararon los medios de cultivo de PDA sin TSA y se inocularon las cepas de *T. atroviride* silvestre o mutante en un extremo y las cepas de *T. virens*, *T. citrinoviride* y *Trichoderma harzianum* en el extremo contrario y se incubaron a 28°C por 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h, y se fotografiaron en los tiempos indicados. El experimento se realizó por triplicado en dos experimentos independientes.

Fotomicrografías de la interacción de las distintas cepas de *T. atroviride* silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ contra *R. solani* por microscopía electrónica de barrido (MEB).

En una caja de Petri con algodón húmedo estéril, se colocó un portaobjetos de vidrio conteniendo 1.5 ml de PDA. Sobre el medio de cultivo se inocularon en un extremo las cepas de *T. atroviride* silvestre o mutante $\Delta tgf-1$ y la cepa de *R. solani*

en el extremo opuesto y se dejaron crecer por 36 h a 28°C. Para el análisis MEB, se fijó la confrontación con glutaraldehído al 3% en PBS (Buffer salino de fosfatos) por 2h. Se enjuagaron 3 veces las muestras con PBS frío por 15 min. Las muestras fueron post-fijadas con OsO₄ al 1% en PBS por 1 h., seguido por 3 lavados con PBS por 15 min y deshidratadas en una serie graduada de etanol. Las muestras se secaron (Tousimis Samdri-PVT- 3D), montaron y recubrieron con oro (Cressington Model 108 auto). Se analizaron por MEB (FEI modelo Quanta 200), las condiciones fueron ajustadas a 18 kV, spot 5, WD 10 mm y las fotomicrografías fueron tomadas con Everhart Thornley Detector (ETD).

Ensayo de antibiosis de las cepas silvestre y mutante Δ tgf-1 *T. atroviride* contra *R. solani*.

Las cepas de *T. atroviride* silvestre (wt) ó mutante Δ tgf-1 fueron crecidas en medio PDB en presencia o ausencia de TSA 300 nM por 7 días. Los cultivos se filtraron utilizando botellas con filtros Corning® de 500 ml, membranas de Nylon con poro de 0.2µm (Corning Life Sciences, Massachusetts, USA). Los filtrados libres de micelio sin TSA (FLM) o filtrados libres de micelio con TSA (FLM/TSA) fueron utilizados para preparar cajas de Petri con PDA a una concentración final de 1X, adicionado con 60% de cada filtrado. Sobre este agar se inoculó la cepa de *R. solani*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* o *S. Rolfsii*, dependiendo de cada experimento. Se incubaron a 28°C por 12, 24, 36, 48 y 60 h. Durante los tiempos indicados se midió el crecimiento radial en mm de los hongos fitopatógenos. Cajas de PDA sin filtrado fueron usadas como control. El experimento se realizó por triplicado en dos experimentos independientes.

Cultivos de *T. atroviride* wt y Δ tgf-1 con inducción del micelio de *R. solani* para los ensayos enzimáticos de quitinasa y proteasa.

Las cepas de *T. atroviride* wt y Δ tgf-1, así como la cepa de *R. solani* se crecieron en medio PDA. De la cepa de *R. solani*, se tomaron 10 inóculos (discos de 0.4 cm) y se inocularon en 500 ml de medio PDB, se dejó crecer en obscuridad a 28°C por

7 días con agitación constante (250 rpm). Se filtró por vacío usando botellas Corning® de 500 mL, con membranas de Nylon con poro de 0.2 µm. Se recuperó el micelio, se lavó 4 veces con agua desionizada y esterilizada, se filtró de nuevo, se liofilizó y molió en N₂ líquido (Lakshman, 2008). Se preparó medio PDB nuevo (500 ml) con 0.7 g de micelio de *R. solani* liofilizado y molido, y se esterilizó. Una vez frío el medio PDB conteniendo el micelio de *R. solani*, se inocularon las cepas de *T. atroviride* wt y Δ *tgf-1*, 10 inóculos (discos de 0.4 cm) cada una en diferente frasco. Se dejaron crecer en la obscuridad a 28°C por 7 días con agitación constante (250 rpm). Se filtró el micelio por vacío usando botellas Corning® de 500 mL, con membranas de Nylon con poro de 0.2 µm. Se recuperó el filtrado libre de micelio (FLM) y se liofilizó. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 500 µl de buffer de fosfatos. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951).

Ensayo enzimático de Proteasa en *T. atroviride*.

La actividad de proteasa fué medida en reacciones de 500 µl, con 100 µl directos de cultivos filtrados libres de micelio (FLM) liofilizado y resuspendido y Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 0.5 mM en MOPS 50 mM, pH 7.0. La reacción se incubó y leyó de acuerdo al protocolo de Flores *et al.* 1997. La actividad fue expresada como nmoles de p-nitroanilina liberada en 1 min (Masuda *et al.*, 1975). La actividad específica fue referida a 1 mg de proteína.

Ensayo enzimático de Quitinasa en *T. atroviride*.

La actividad de quitinasa fué analizada en reacciones de 600 µl, 300 µl de quitina coloidal al 1% pH 6.6 y 300 µl de FLM liofilizado y resuspendido, diluído 1:100. La reacción se incubó por 30 min y leyó adicionando ácido dinitrosalicílico de acuerdo a Wen *et al.*, 2002. Una unidad de actividad de quitinasa se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de azúcar reducida detectable en 1 min a 37°C.

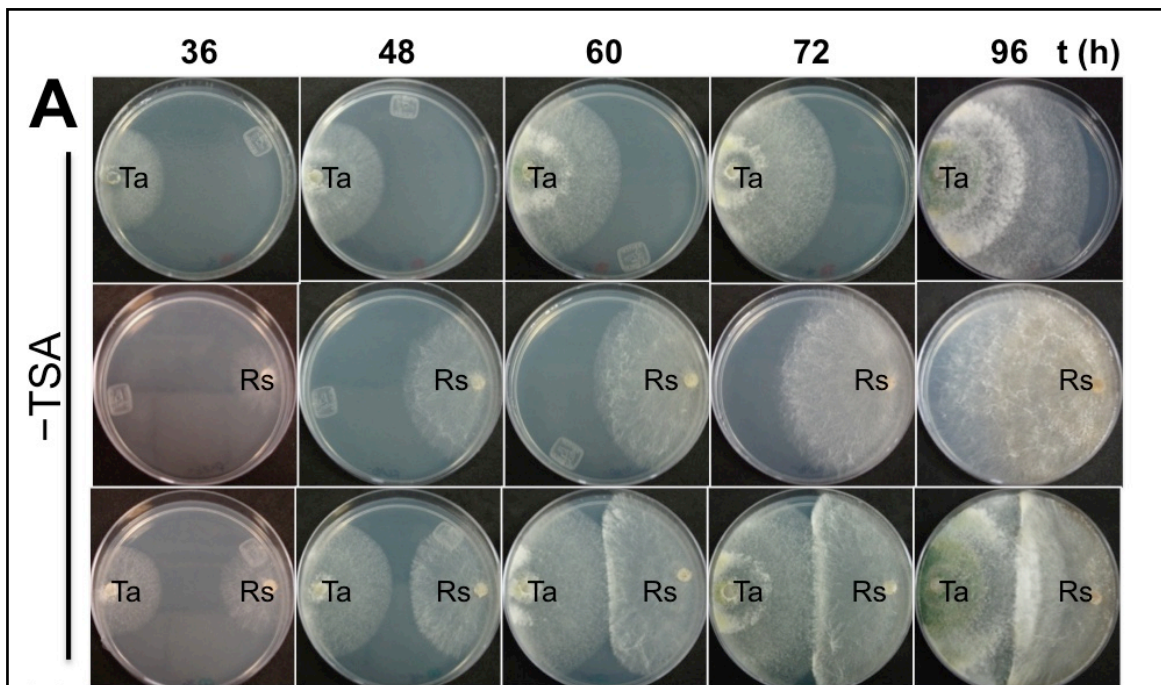
Expresión relativa de del gen *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* en las cepas wt y Δ *tgf-1* de *T. atroviride* en confrontación con *R. solani*.

El experimento se realizó como en la sección de cultivos duales, inoculando las cepas de *T. atroviride* wt y Δ *tgf-1* en un extremo de la caja y a *R. solani* en el extremo opuesto, colocando un celofan sobre el medio PDA. Los cultivos duales fueron co-incubados por 36, 48, 60 h a 28°C, se recolectó el micelio de las cepas wt y Δ *tgf-1* de *T. atroviride* en los tiempos indicados; el micelio se congeló y molió en N₂ líquido para la extracción de RNA total por el método de Trizol® (Invitrogen^R, Life technologiesTM, New York, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. 5 µg de RNA total, se trataron con DNAsa Turbo (Ambion, Life technologiesTM, New York, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó el cDNA utilizando el Superscript Kit® (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Posteriormente, el cDNA se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000, Thermo scientific, Delaware, USA). Y la expresión relativa de los genes fue cuantificada por qPCR (Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System), usando el reactivo Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del proveedor, en un volumen final de 20 µl por reacción. Para correr las reacciones se usó el programa estándar del equipo, con excepción de la temperatura de alineamiento para los oligonucleótidos (Anexo 2), la cual fue de 62°C. Los experimentos se realizaron por triplicado y los blancos por duplicado en dos experimentos independientes. Para calcular la expresión relativa de los genes se empleó el método $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

RESULTADOS

La Tricostatina A (TSA) no afecta el crecimiento de *T. atroviride*

Para explorar la participación de la acetilación de las histonas en la capacidad biocontroladora de *T. atroviride*, se realizaron confrontaciones contra el hongo fitopatógeno *R. solani* en presencia de TSA. *T. atroviride* se inoculó solo o en cultivo dual con *R. solani* en medio PDA con o sin 300 nM de TSA. Los cultivos duales fueron analizados y fotografiados a las 36, 48, 60, 72 y 96 h de interacción. La presencia de TSA en el medio de crecimiento afectó ligeramente el crecimiento de ambos hongos (Figura 3B), comparado con sus respectivos controles sin TSA (Figura 3A). Sin embargo, la capacidad de *T. atroviride* de sobrecrecer a *R. solani* no fue afectada por la presencia del inhibidor (Figura 3B).



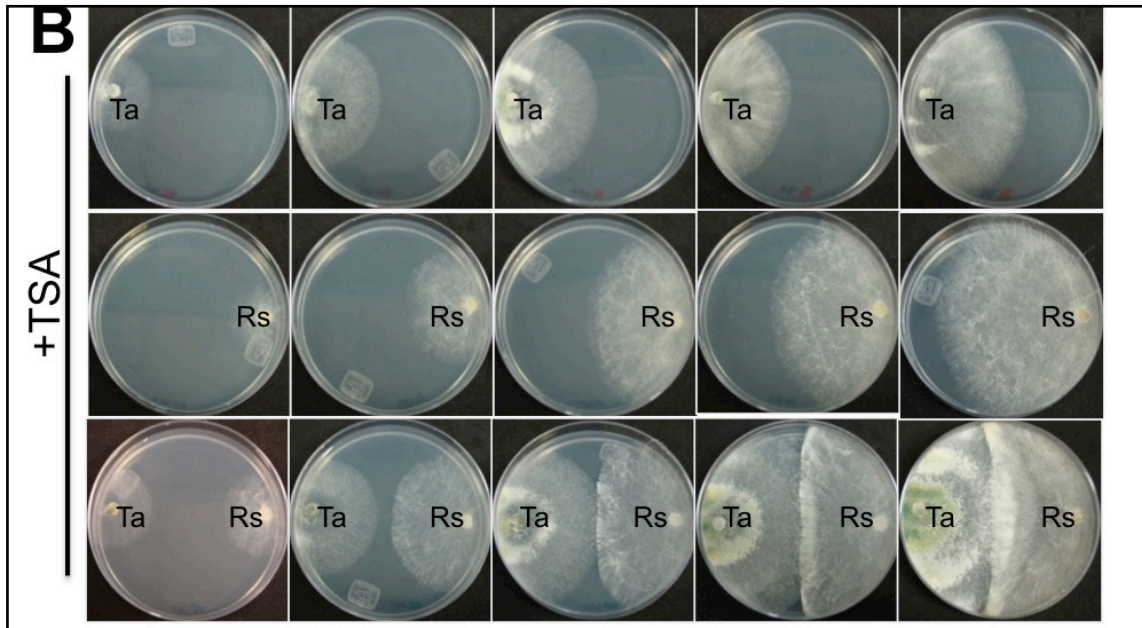


Figura 3. La TSA no afecta el sobrecrecimiento de *T. atroviride* sobre *R. solani*. Confrontaciones de *T. atroviride* (Ta) contra *R. solani* (Rs) en medio PDA, en ausencia (A) o presencia (B) de Tricostatina A 300 nM, crecidos a 28 °C. Se incluyeron como controles a ambos hongos creciendo solos. Se tomaron fotografías a las 36, 48, 60, 72 and 96 h de interacción.

La adición de TSA en el medio de crecimiento de *T. atroviride* aumenta su efecto inhibitor sobre el crecimiento de *R. solani*

El genero *Trichoderma* spp. es capaz de sintetizar una gran cantidad de compuestos antimicrobianos para combatir a los hongos fitopatógenos. Para determinar si la TSA tiene un efecto en la síntesis de compuestos antimicrobianos en *T. atroviride*, se creció a *T. atroviride* en medio PDB por 7 días a 28 °C en ausencia o presencia de TSA 300 nM. Después filtramos el cultivo para eliminar el micelio (Filtrado Libre de Micelio de *T. atroviride*; FML) y se utilizó para preparar medio PDA 1X con 60% de FLM y en el centro de las cajas se inoculó a *R. solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea* o *Fusarium oxysporum*, en cajas independientes. Posteriormente, se midió el crecimiento radial en milímetros (mm) a las 12, 24, 36, 48 y 60 h. La presencia del FLM de *T. atroviride* en el medio PDA inhibió el crecimiento radial de *R. solani* comparado con el control (Figura 4). Además, la adición del FLM/TSA (FLM de *T. atroviride* crecido en presencia de

TSA) aumentó el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *R. solani* comparado al medio con y sin TSA (Figura 4).

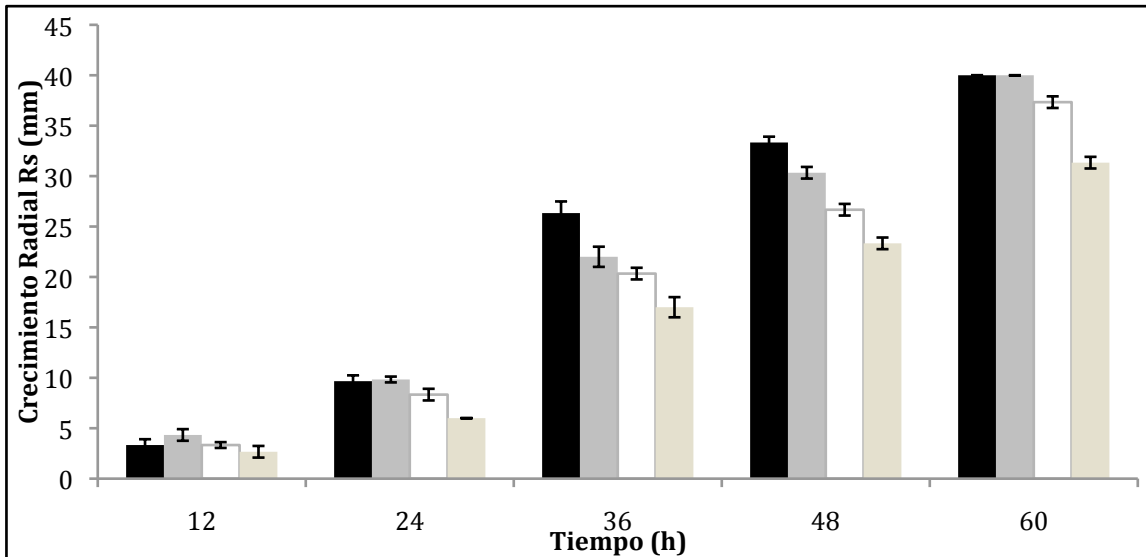


Figura 4. Ensayo de antibiosis de *T. atroviride* contra *R. solani*.

T. atroviride creció en medio PDB adicionado o no con TSA 300nM, en frascos incubados por 7 días a 28°C. El FLM (Filtrado Libre de Micelio de *T. atroviride*) se adicionó a una concentración final de 60% al medio PDA. El crecimiento radial de *R. solani* se midió a las 12, 24, 36, 48 y 60 h post-inoculación. Barras negras= *R. solani* en PDA, barras grises= *R. solani* en PDA+TSA, barras blancas= *R. solani* en PDA+FLM de *T. atroviride* al 60% y barras beige= *R. solani* en PDA+FLM/TSA de *T. atroviride* al 60%.

Para estudiar si *T. atroviride* usa la misma estrategia de antagonismo contra otros hongos fitopatógenos, se decidió analizar cómo sería la capacidad antibiótica de *T. atroviride*, en el crecimiento de *S. rolfsii*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*. Se observó que en presencia del FLM de *T. atroviride*, disminuye el crecimiento de *S. rolfsii* comparado con el crecimiento en PDA solo (Figura 5). Y que la presencia del FLM/TSA de *T. atroviride*, afecta el crecimiento de *S. rolfsii* igual que el FLM de *T. atroviride* a las 60 h (Figura 5).

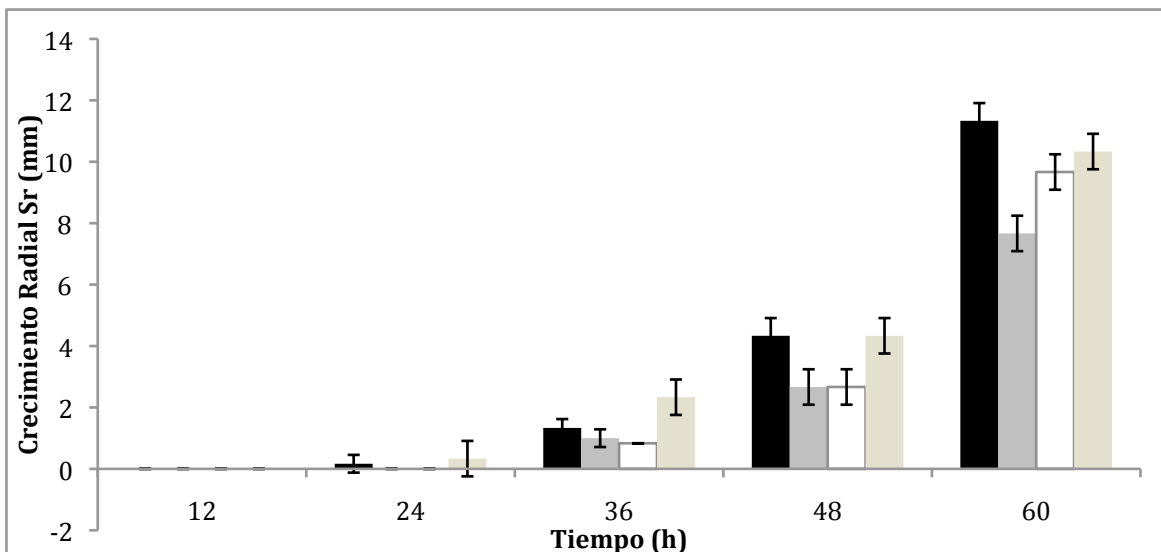


Figura 5. Ensayo de antibiosis de *T. atroviride* contra *S. rolfsii*.

T. atroviride creció en medio PDB adicionado o no con TSA 300nM, en frascos incubados por 7 días a 28°C. El FLM se adicionó a una concentración final de 60% al medio PDA. El crecimiento radial de *S. rolfsii* se midió a las 12, 24, 36, 48 y 60 h post-inoculación. Barras negras= *S. rolfsii* en PDA, barras grises= *S. rolfsii* en PDA/TSA, barras blancas= *S. rolfsii* en PDA + FLM de *T. atroviride* al 60% y barras beige= *S. rolfsii* en PDA + FLM/TSA de *T. atroviride* al 60%.

Por otro lado, se observó que el crecimiento de *B. cinerea* disminuye en presencia del FLM de *T. atroviride* a las 48 h en comparación con su control(Figura 6).

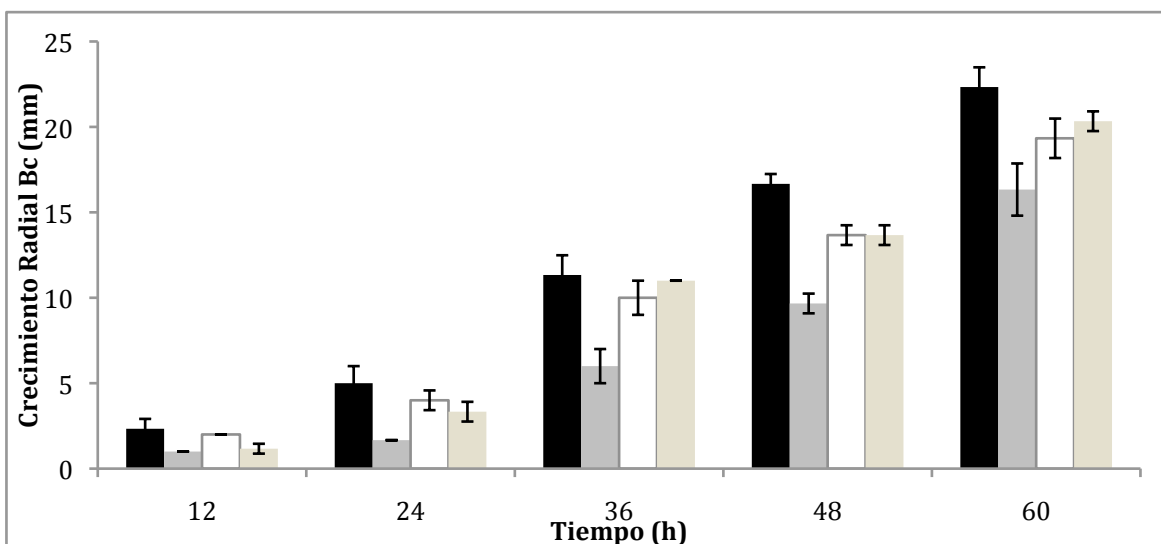


Figura 6. Ensayo de antibiosis de *T. atroviride* contra *B. cinerea*.

T. atroviride creció en medio PDB adicionado o no con TSA 300nM, en frascos incubados por 7 días a 28°C. El FLM se adicionó a una concentración final de 60% al medio PDA. El crecimiento radial de *B. cinerea* se midió a las 12, 24, 36, 48 y 60 h post-inoculación.

Barras negras= *B. cinerea* en PDA, barras grises= *B. cinerea* en PDA/TSA, barras blancas= *B. cinerea* en PDA + FLM de *T. atroviride* al 60% y barras beige= *B. cinerea* en PDA + FLM/TSA de *T. atroviride* al 60%.

Finalmente, se observó que el crecimiento de *F. oxysporum* se mantiene igual en presencia de FLM de *T. atroviride* en comparación con su control (Figura 7). Y en presencia de FLM/TSA de *T. atroviride*, *F. oxysporum* presenta el mismo crecimiento como si solo estuviera en presencia del FLM de *T. atroviride* (Figura 7).

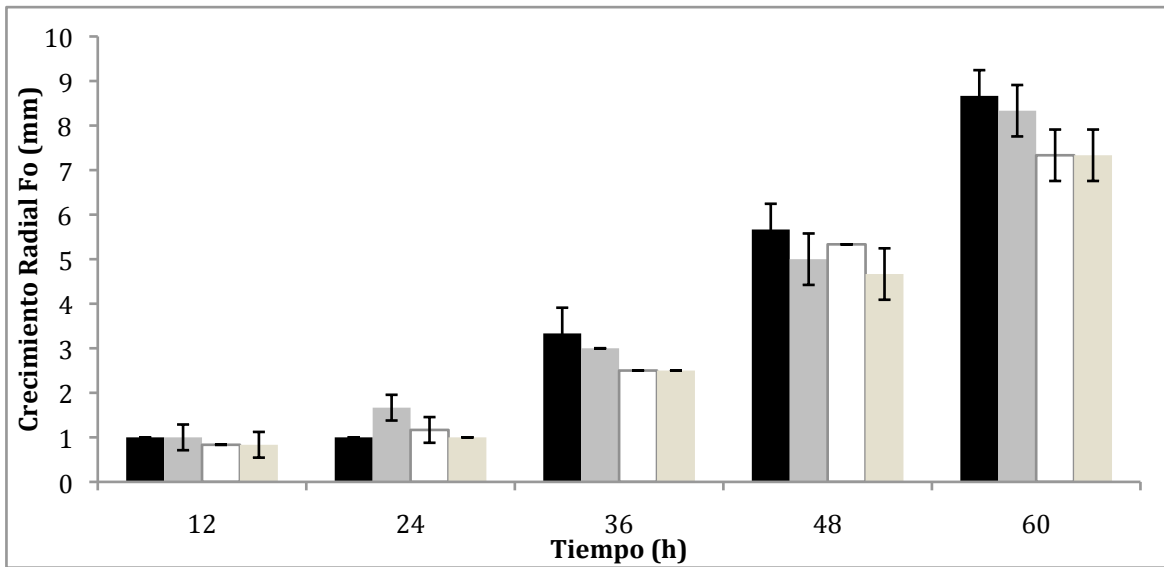


Figura 7. Ensayo de antibiosis de *T. atroviride* contra *F. oxysporum*.

T. atroviride se creció en medio PDB adicionado o no con TSA 300nM, en frascos incubados por 7 días a 28°C. El FLM se adicionó a una concentración final de 60% al medio PDA. El crecimiento radial de *F. oxysporum* se midió a las 12, 24, 36, 48 y 60 h post-inoculación. Barras negras= *F.oxysporum* en PDA, barras grises= *F.oxysporum* en PDA/TSA, barras blancas= *F.oxysporum* en PDA + FLM de *T. atroviride* al 60% y barras beige= *F.oxysporum* en PDA + FLM/TSA de *T. atroviride* al 60%.

La TSA afecta negativamente la expresión génica de *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* en presencia de *R. solani*

Para evaluar si la presencia de TSA en el medio de cultivo afecta la expresión de genes relacionados al micoparasitismo (*ech-42* y *prb-1*) y genes relacionados al metabolismo secundario (*pbs-1* y *tps-1*) en *T. atroviride*, realizamos cultivos duales de este hongo contra *R. solani* en PDA en ausencia o presencia de TSA 300nM.

En ausencia de TSA pero en presencia de *R. solani*, la expresión de *ech-42* se mantuvo sin cambios, mientras que *prb-1* y *tps-1* aumentaron su expresión a las 36 h. Sin embargo, la expresión de los tres genes disminuyó a las 48 h y después volvió a aumentar a las 60 h de co-cultivo (Figura 8A, B y D). Por otro lado, el gen *pbs-1* no fue expresado en todos los tiempos (Figura 8C).

La presencia de TSA en el medio de cultivo en ausencia de *R. solani*, indujo la expresión de *ech-42* y *tps-1* a las 36 h (Figura 8E, H); pero la expresión de *ech-42* disminuyó en presencia de *R. solani* (Figura 8E). Además, la expresión de *tps-1* pero no de *ech-42*, *prb-1* y *pbs-1* se incrementó a las 48 h. Sin embargo, la expresión de *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* fue más alta a las 60 h después de la adición de TSA en ausencia de *R. solani*; pero no fueron expresados en presencia del fitopatógeno (Figura 8F, G y H) con excepción de *ech-42*. Ya que la presencia de TSA y *R. solani*, reprimió la expresión de *ech-42* a las 36 y 48 h, pero *ech-42* fue sobreexpresada a las 60 h de cocultivo comparada con los tiempos respectivos en presencia de solo TSA (Figura 8E).

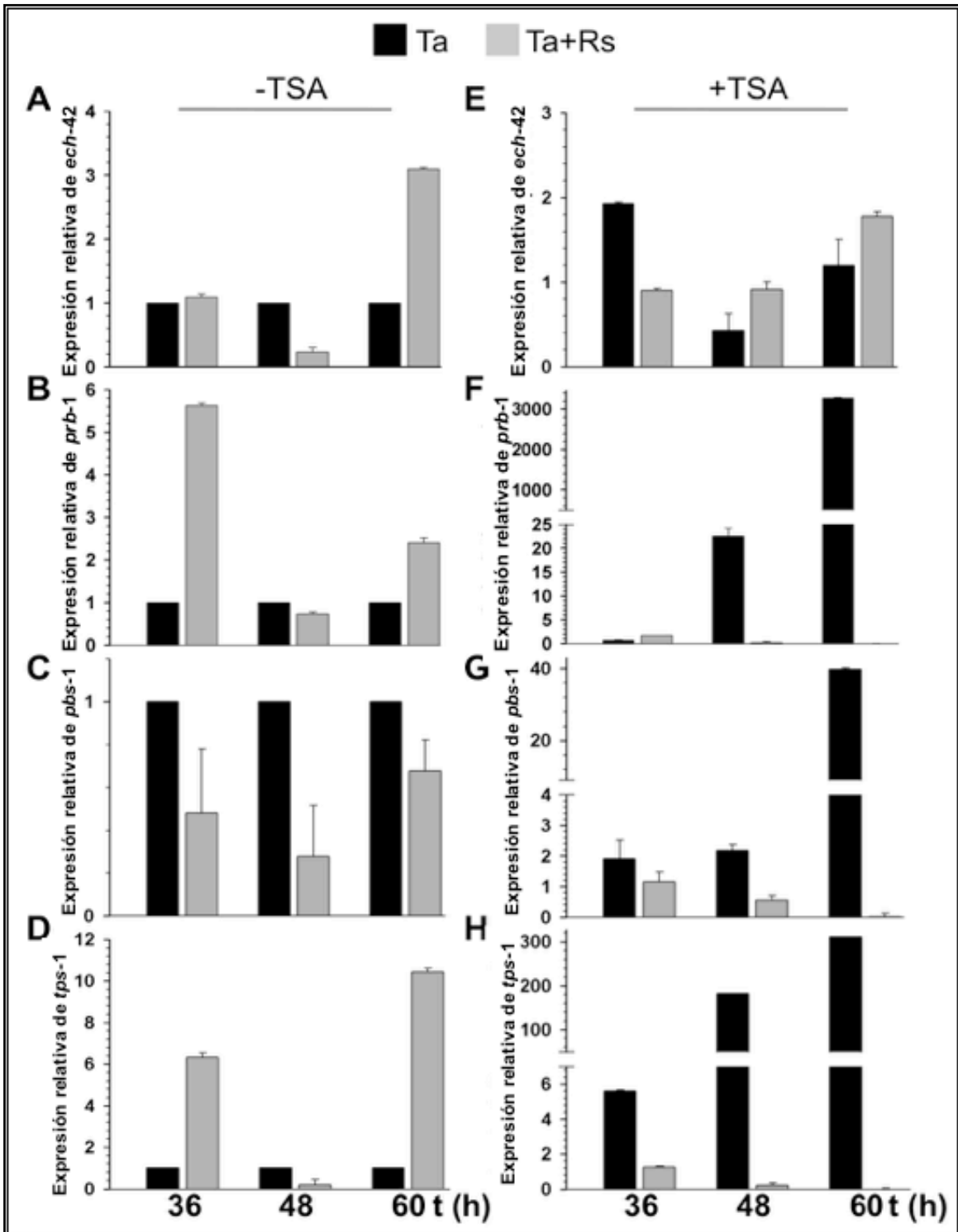


Figura 8. La presencia de TSA y *R. solani* afecta negativamente la expresión de los genes *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* en *T. atroviride*.

T. atroviride y *R. solani* fueron co-cultivados en PDA (A, B, C and D) o PDA+TSA 300 nM (E, F, G and H) a 28 °C. El micelio de *T. atroviride* fue colectado a las 36, 48 and 60 h. La expresión relativa fue calibrada con el gen *act-1* como control interno y normalizada contra la cepa silvestre en la ausencia del fitopatógeno. *ech-42* = gen endoquitinasa de 42-kDa,

prb-1 = gen de proteinasa, *pbs-1*= gen de peptaibol sintetasa 1, and *tps-1* = gene terpeno sintetasa 1. Barras negras = *T. atroviride* creciendo sola, barras grises= *T. atroviride* vs *R. solani* (Ta+Rs).

La delección de *tgf-1* no afecta la capacidad micoparasítica de *T. atroviride* contra *R. solani*

Con base en los resultados anteriores, se decidió evaluar a la cepa mutante *tgf-1* (gen ortólogo a la acetiltransferasa de histonas Gcn5 de *S. cerevisiae*) de *T. atroviride* (Uresti-Rivera *et al.*, en preparación). Se analizó primero, el fenotipo de crecimiento de la cepa silvestre (wt) y la cepa Δ *tgf-1*, en medio PDA por 72 h, bajo un régimen de 12:12 h luz:oscuridad. La cepa Δ *tgf-1* presentó un crecimiento lento y ausencia de la típica conidia verde comparada a la cepa silvestre (Figura 9A y B). En fotomicrografías tomadas por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) de la cepa Δ *tgf-1* observamos un micelio delgado, plano y menos ramificado comparado con la cepa silvestre (Figura 9C y D).

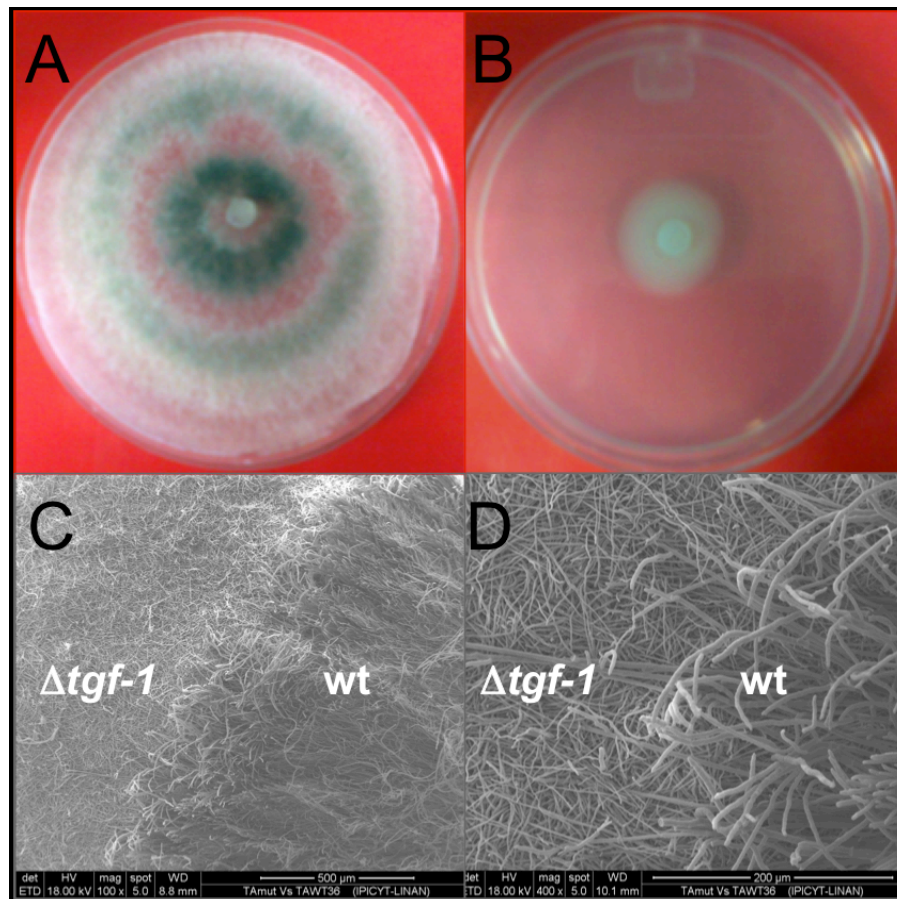


Figura 9. Morfología y desarrollo de las cepas de *T. atroviride* wt y Δ tgf-1.

T. atroviride wt (A) y Δ tgf-1 (B) fueron crecidas en PDA por 7 days a 28 °C. Ambas cepas fueron co-cultivadas en medio PDA, fijadas y analizadas por MEB a 100X (C) y 400X (D). wt = *T. atroviride* cepa silvestre y Δ tgf-1 = *T. atroviride* cepa mutante Δ tgf-1.

Para determinar si el producto de Δ tgf-1 de *T. atroviride* está involucrado en la capacidad antagónica contra *R. solani*, se realizaron cultivos duales de la cepa wt o Δ tgf-1 contra el fitopatógeno. La cepa silvestre fue capaz de sobrecrecer a *R. solani* (Figura 10A), mientras que la cepa mutante Δ tgf-1 apenas fue capaz de entrar en contacto con el fitopatógeno (Figura 10B). Las diferentes cepas creciendo solas fueron incluidas como controles (Anexo 3, figura suplementaria S1).

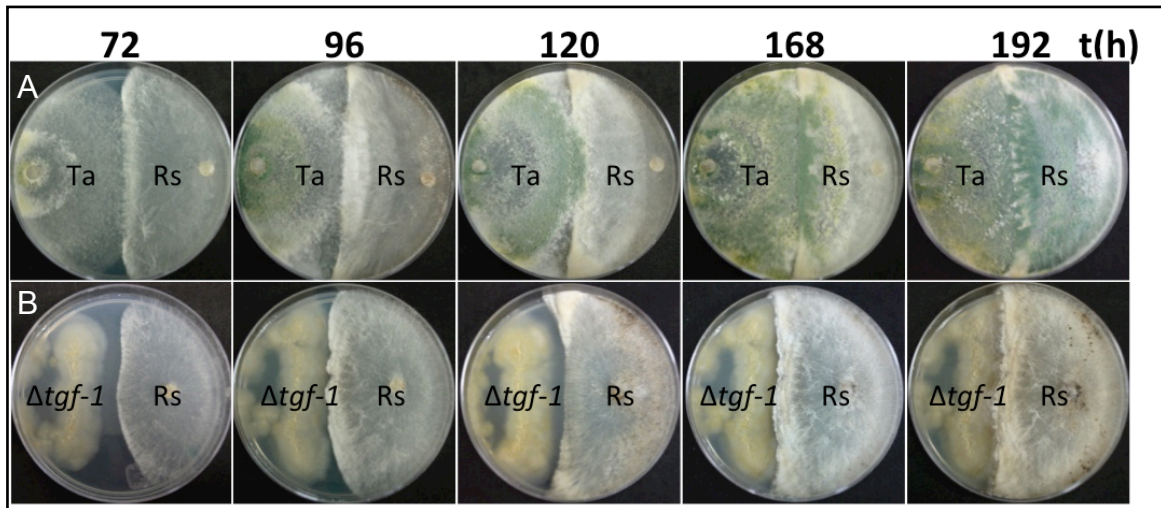


Figura 10. Ensayos de cultivos duales de las cepas *T. atroviride* wt y Δ tgf-1 contra *R. solani*.

Se inocularon las cepas silvestre de *T. atroviride* y Δ tgf-1 del lado izquierdo de la caja de Petri y la cepa de *R. solani* del lado derecho. Los cultivos duales se incubaron a 28 °C y se fotografiaron a las 72, 96, 120, 168 y 192 h. Ta = *T. atroviride* cepa silvestre, Δ tgf-1 = *T. atroviride* cepa mutante Δ tgf-1, Rs = *R. solani*.

Dado que la cepa mutante Δ tgf-1 fue apenas capaz de entrar en contacto con hongo fitopatógeno en los diferentes tiempos analizados, la zona de interacción de un cultivo dual a 192 h, fue analizada por MEB. Se observó que tanto la cepa silvestre (Figura 11A y C) como la mutante (Figura 11B y D), fueron capaces de enrollarse alrededor de las hifas del fitopatógeno.

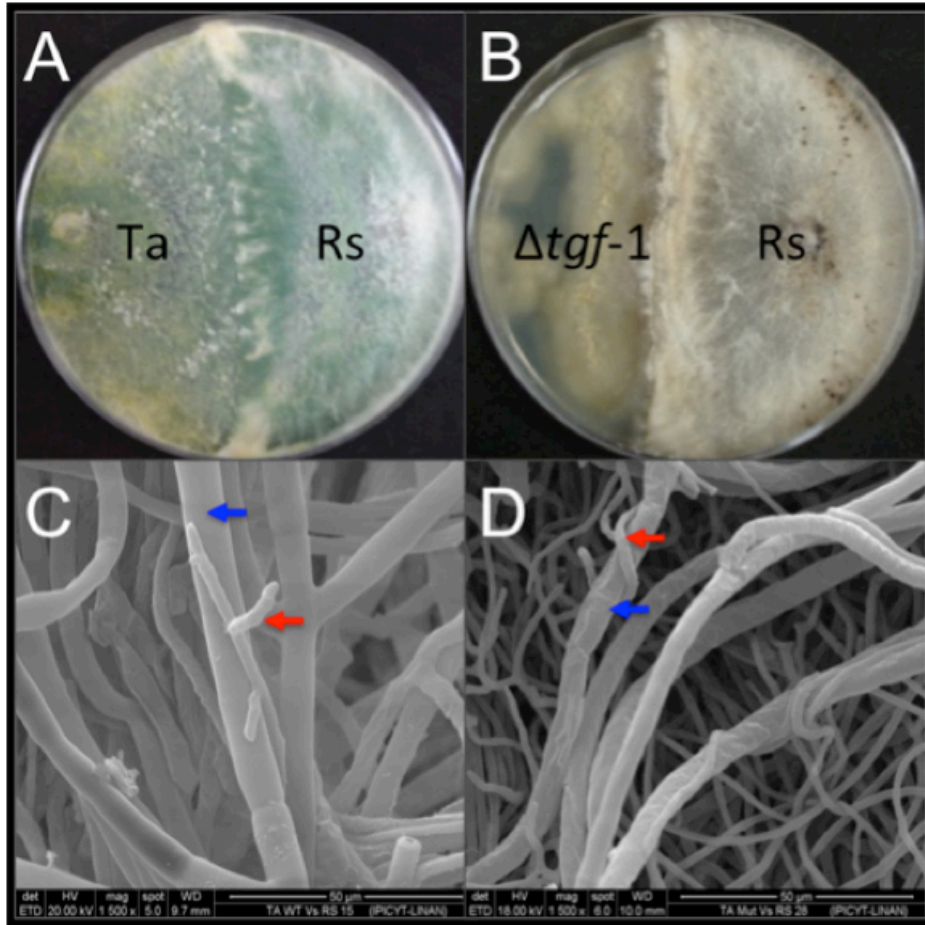


Figura 11. La delección de *tgf-1* no afecta la capacidad micoparasítica de *T. atroviride* contra *R. solani*.

Cultivos duales de las cepas *T. atroviride* wt y $\Delta tgf-1$ contra *R. solani* fueron analizados por MEB (C y D, respectivamente). Las flechas azules indica las hifas de *R. solani*, y las flechas rojas indica las hifas de *T. atroviride* wt (C) y $\Delta tgf-1$ (D) enrolladas sobre el fitopatógeno. Las fotomicrografías están ampliadas 1,500X.

Para determinar si la cepa mutante era capaz de reconocerse o reconocer a su cepa parental, se realizaron cultivos duales de la cepa mutante $\Delta tgf-1$ contra ella misma, contra la cepa parental y otras cepas pertenecientes al género *Trichoderma*. Se observó que la cepa mutante $\Delta tgf-1$ fue sobrecrecida por otras especies del género *Trichoderma* (Figura 12E, G e I) en comparación con su cepa parental-wt (Figura 12D, F y H). También, la cepa mutante $\Delta tgf-1$ fue incapaz de detener el crecimiento de las otras especies de *Trichoderma*, mostrando un color café en el área de contacto en algunos casos, indicando lisis de las hifas (Figura 12G-I). La confrontación de la cepa mutante $\Delta tgf-1$ contra ella misma, no mostró

cambios significativos en ninguna de las dos colonias (Figura 12B); sin embargo, cuando la cepa mutante $\Delta tgf-1$ fue confrontada contra su cepa parental, la cepa mutante mostró una zona de lisis (Figura 12C). Las diferentes cepas creciendo solas fueron incluidas como controles (Anexo 3, figura suplementaria S2).

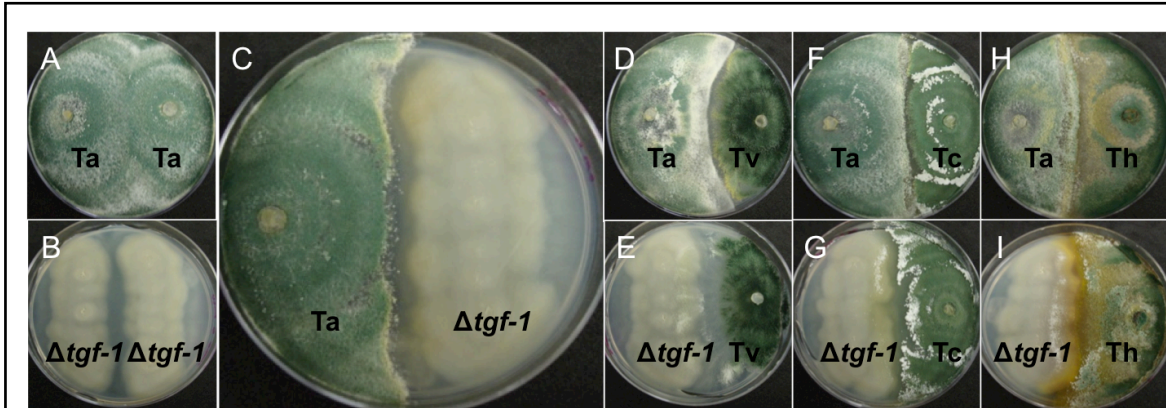


Figura 12. Ensayo de antagonismo de la cepa mutante $\Delta tgf-1$ contra otras especies de *Trichoderma*.

Cultivos duales de *T. atroviride* wt y $\Delta tgf-1$ están indicadas del lado izquierdo de la caja de Petri, contra otras especies de *T. atroviride*, indicadas del lado derecho; creciendo a 28 °C por 36, 48, 60, 72, 84 and 96 h. Ta= *T. atroviride*, Ta $\Delta tgf-1$ = *T. atroviride* $\Delta tgf-1$, Tv= *T. virens*, Tc= *T. citrinoviride*, Th= *Trichoderma harzianum*.

La cepa mutante $\Delta tgf-1$ tiene un efecto de inhibición mayor sobre el crecimiento de *R. solani*

Dado que la cepa mutante $\Delta tgf-1$ inhibió el crecimiento de *R. solani* un poco más que la cepa silvestre antes de entrar en contacto (Anexo 3, figura suplementaria S2); decidimos evaluar la capacidad del FLM de la cepa mutante $\Delta tgf-1$ para inhibir el crecimiento de *R. solani*. Se prepararon cajas con PDA o PDA+FLM e inoculamos en el centro a *R. solani* y se midió el crecimiento radial del fitopatógeno a las 12, 24, 36, 48 y 60 h. El FLM de la cepa mutante $\Delta tgf-1$ inhibió el crecimiento de *R. solani* de manera más eficiente que la cepa silvestre (Figura 13). Por otro lado, la adición de TSA en el medio de crecimiento de la cepa $\Delta tgf-1$ disminuyó el efecto negativo del FLM sobre el crecimiento radial del hongo fitopatógeno, comparado con su control sin la adición de TSA; pero el efecto

inhibitorio del FLM de la cepa mutante fue igual al observado con el FLM/TSA de la cepa silvestre (Figura 13).

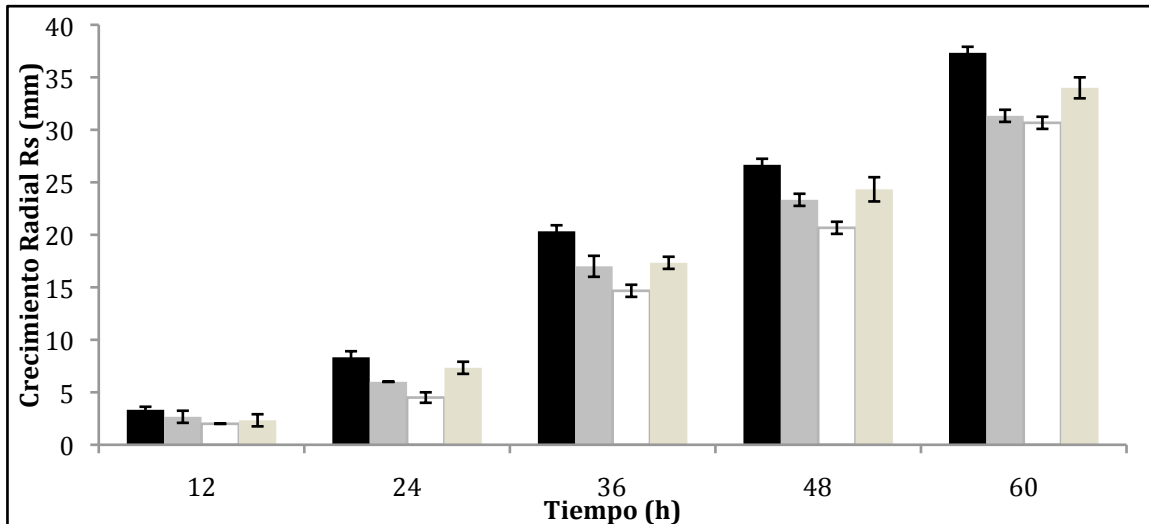


Figura 13. Ensayo de antibiosis de la cepa Δ tgf-1 de *T. atroviride* contra *R. solani*. Las cepas wt y Δ tgf-1 se crecieron por 7 días, a 28 °C, en medio PDB en presencia o ausencia de TSA 300nM. El FLM se añadió al medio PDA 1X al 60%. *R. solani* fue inoculado y se midió su crecimiento radial a las 12, 24, 36, 48 y 60 h. Barras negras = *R. solani* creciendo en PDA+ FLM de *T. atroviride* wt, barras grises= *R. solani* creciendo en PDA+ FLM/TSA de *T. atroviride* wt, barras blancas= *R. solani* en PDA + FLM de *T. atroviride* Δ tgf-1 y barras beige= *R. solani* en PDA + FLM/TSA de *T. atroviride* Δ tgf-1.

Así mismo, se analizó la capacidad antibiótica de la cepa mutante Δ tgf-1 de *T. atroviride* contra diferentes cepas de hongos fitopatógenos. Se observó que en presencia del FLM de *T. atroviride* de la cepa mutante Δ tgf-1 en el medio de crecimiento, aumentó el crecimiento de *S. rolfsii* en comparación a su crecimiento en presencia del FLM de la cepa silvestre (Figura 14). Y la presencia de FLM/TSA de *T. atroviride* de la cepa mutante Δ tgf-1, disminuyó el crecimiento de *S. rolfsii* (Figura 14).

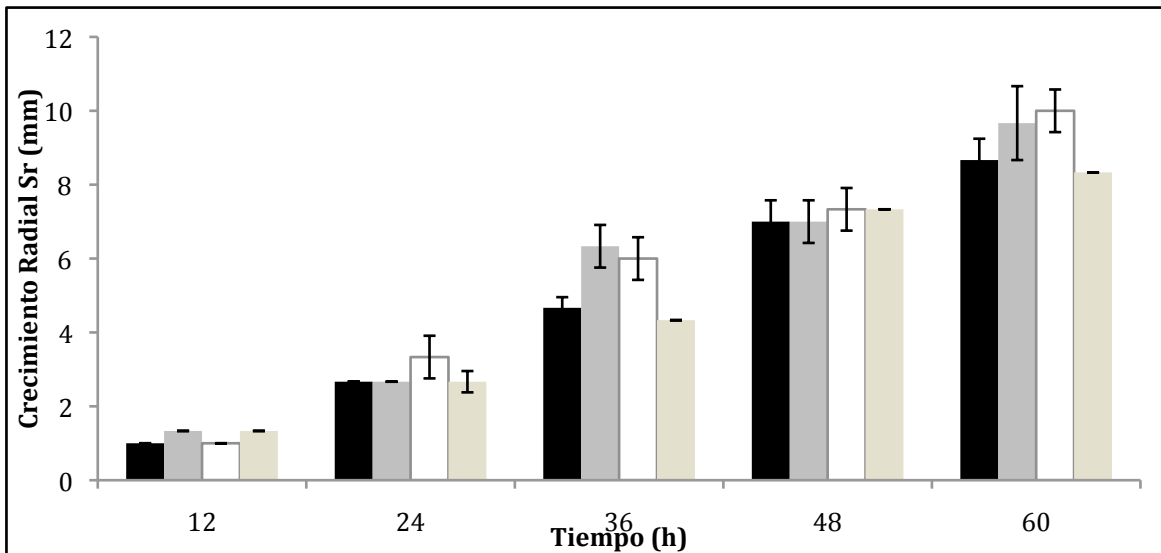


Figura 14. Ensayo de antibiosis de la cepa Δ tgf-1 de *T. atroviride* contra *S. rolfsii*.

Las cepas silvestre y mutante Δ tgf-1 se crecieron por 7 días, a 28 °C, en medio PDB en presencia o ausencia de TSA 300nM. El FLM se añadió al medio PDA 1X al 60%. *S. rolfsii* fue inoculado y se midió su crecimiento radial a las 12, 24, 36, 48 y 60 h. Barras negras = *S. rolfsii* creciendo en PDA+ FLM de *T. atroviride* wt, barras grises= *S. rolfsii* creciendo en PDA+ FLM/TSA de *T. atroviride* wt, barras blancas= *S. rolfsii* en PDA + FLM de *T. atroviride* Δ tgf-1 y barras beige= *S. rolfsii* en PDA + FLM/TSA de *T. atroviride* Δ tgf-1.

Por otro lado, se observó que el crecimiento de *B. cinerea* aumentó en presencia del FLM de la cepa mutante Δ tgf-1 de *T. atroviride* (Figura 15). En presencia de FLM de la cepa silvestre o FLM/TSA de la cepa mutante Δ tgf-1 de *T. atroviride*, *B. cinerea* mantuvo su crecimiento (Figura 15).

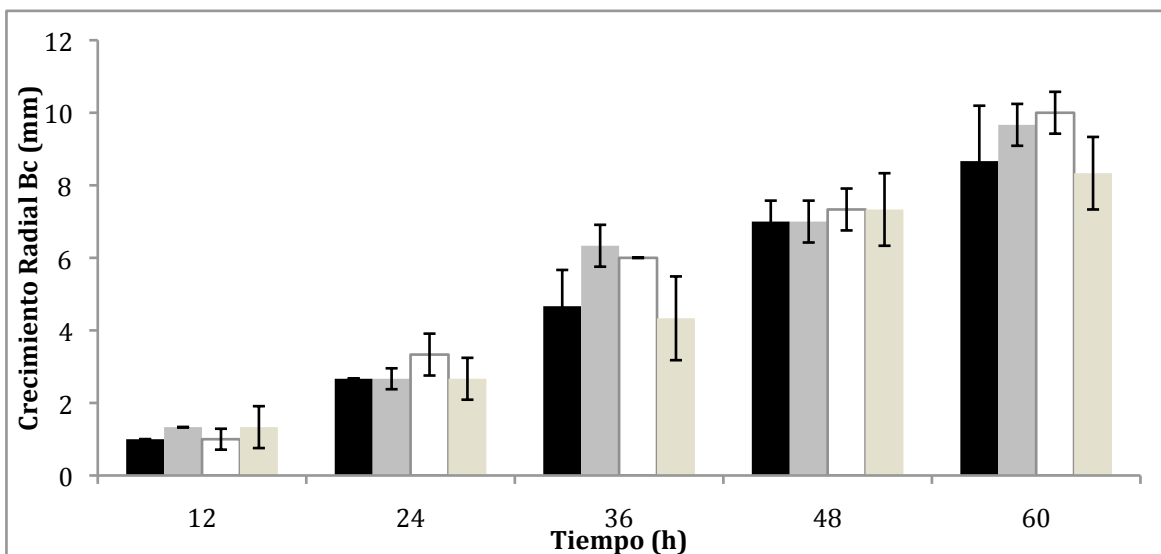


Figura 15. Ensayo de antibiosis de la cepa $\Delta tgf-1$ de *T. atroviride* contra *B. cinerea*.

La cepa silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ se crecieron por 7 días, a 28 °C, en medio PDB en presencia o ausencia de TSA 300nM. El FLM se añadió al medio PDA 1X al 60%. *B. cinerea* fue inoculado y se midió su crecimiento radial a las 12, 24, 36, 48 y 60 h. Barras negras = *B. cinerea* creciendo en PDA+ FLM de *T. atroviride* wt, barras grises= *B. cinerea* creciendo en PDA+ FLM/TSA de *T. atroviride* wt, barras blancas= *B. cinerea* en PDA + FLM de *T. atroviride* $\Delta tgf-1$ y barras beige= *B. cinerea* en PDA + FLM/TSA de *T. atroviride* $\Delta tgf-1$.

Finalmente, se observó que el crecimiento de *F. oxysporum* se incrementó en presencia del FLM de la cepa mutante $\Delta tgf-1$ de *T. atroviride* (Figura 16); y que la presencia del FLM/TSA *T. atroviride* de la cepa mutante $\Delta tgf-1$ en el medio, disminuyó el crecimiento de *F. oxysporum* (Figura 16).

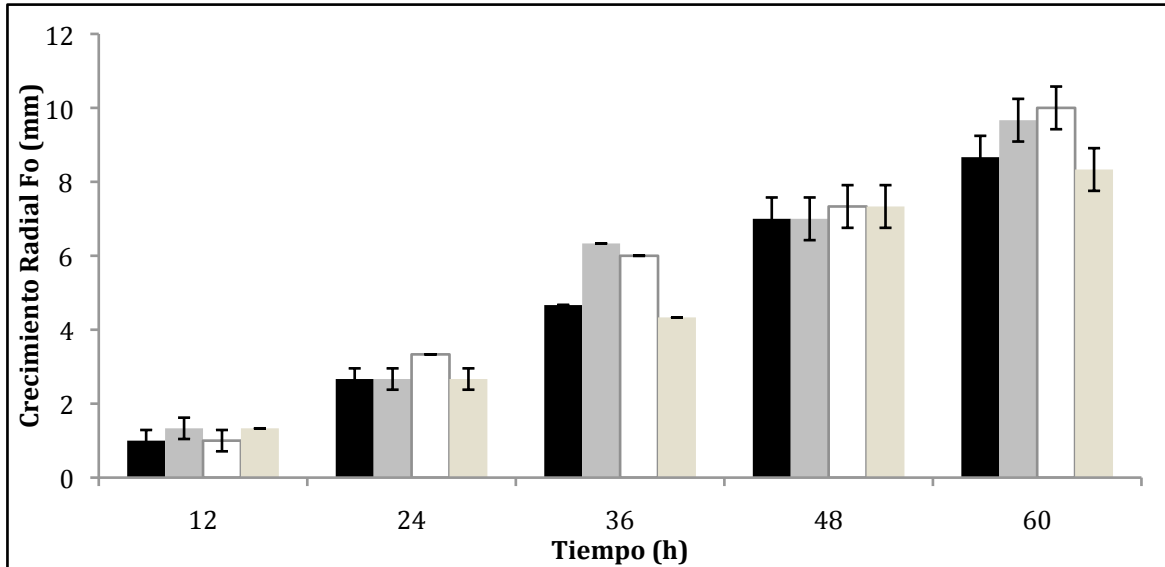


Figura 16. Ensayo de antibiosis de la cepa $\Delta tgf-1$ de *T. atroviride* contra *F. oxysporum*.

Las cepas silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ se crecieron por 7 días, a 28 °C, en medio PDB en presencia o ausencia de TSA 300nM. El FLM se añadió al medio PDA 1X al 60%. *F. oxysporum* fue inoculado y se midió su crecimiento radial a las 12, 24, 36, 48 y 60 h. Barras negras = *F. oxysporum* creciendo en PDA+ FLM de *T. atroviride* wt, barras grises= *F. oxysporum* creciendo en PDA+ FLM/TSA de *T. atroviride* wt, barras blancas= *F. oxysporum* en PDA + FLM de *T. atroviride* $\Delta tgf-1$ y barras beige= *F. oxysporum* en PDA + FLM/TSA de *T. atroviride* $\Delta tgf-1$.

La cepa mutante $\Delta tgf-1$ presenta una actividad quitinolítica constitutiva pero una actividad proteolítica inducible

Es bien conocido que las enzimas líticas, como las quitinasas y las proteasas, son usadas por algunas especies del género *Trichoderma* como un mecanismo de biocontrol contra hongos fitopatógenos (Harman, 2006). Para entender si la actividad quitinolítica y proteolítica de *T. atroviride* fueron afectadas en la cepa mutante $\Delta tgf-1$ y si están contribuyendo en la inhibición del crecimiento de *R. solani* observado, determinamos estas actividades enzimáticas en cultivos de *T. atroviride* wt y $\Delta tgf-1$ en cultivos inducidos por la presencia de micelio de *R. solani* (Figura 17). Ambos FLM de la cepa wt y $\Delta tgf-1$ mostraron actividad proteolítica similar bajo las condiciones de control, pero en presencia del micelio de *R. solani*, ambas actividades enzimáticas se incrementaron en niveles similares (Figura 17A).

Por otro lado, la cepa wt presentó una actividad quitinolítica aumentada en presencia del micelio de *R. solani*, comparada con el control; donde la cepa mutante $\Delta tgf-1$ mostró actividad quitinolítica aumentada en ausencia del micelio de *R. solani*, la cual fue significativamente más alta que la actividad presentada por la cepa wt en presencia de *R. solani*. La presencia del micelio de *R. solani* en el medio de crecimiento de la cepa mutante $\Delta tgf-1$, no aumentó su actividad quitinolítica comparada con su control (Figura 17B).

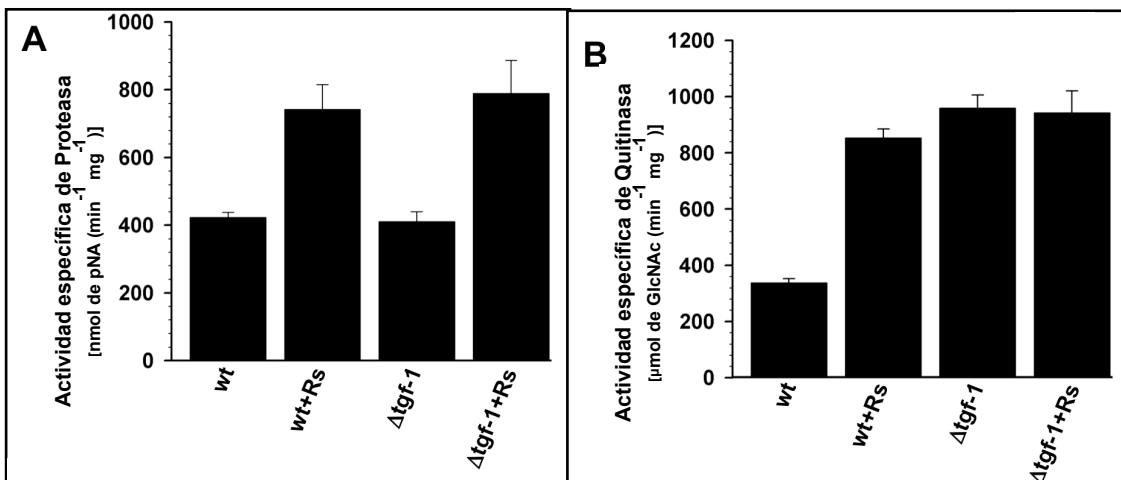


Figura 17. TGF-1 regula negativamente la actividad quitinolítica, pero no la actividad proteolítica en *T. atroviride*.

Las cepas silvestre y mutante $\Delta tgf-1$ fueron crecidas en medio PDB adicionado o no con micelio de *R. solani*, e incubadas a 28 °C por 7 días y la actividad quitinolítica y proteolítica fueron medidas. wt = *T. atroviride* cepa silvestre, wt+Rs= *T. atroviride* cepa silvestre+ micelio de *R. solani*, $\Delta tgf-1$ = *T. atroviride* cepa mutante de $\Delta tgf-1$, $\Delta tgf-1$ +Rs= *T. atroviride* cepa mutante $\Delta tgf-1$ + micelio de *R. solani*. A) nmoles de p-nitroanilina liberada por minuto por 1 mg de proteína, B) μ moles de N-acetil-D-glucosamina liberada por minuto por mililitro.

TGF-1 y TSA regulan diferencialmente la expresión de *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1*

Para evaluar si TGF-1 participa en la regulación de genes relacionados al micoparasitismo y al metabolismo secundario, los niveles de expresión de *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* fueron analizados en la cepa mutante $\Delta tgf-1$ y comparados con la cepa parental en confrontaciones con *R. solani*, en ausencia y presencia de TSA 300 nM. En ausencia de TSA y *R. solani*, el gen *ech-42* mostró un ligero cambio en su expresión a las 48 y 60 h (Figura 18A), mientras que *pbs-1* y *tps-1* fueron más inducidos a las 36 y 48 h, pero reprimidos a las 60 h (Figura 18C y D). El gen *prb-1* fue inducido a las 48 h pero reprimido a las 60 h (Figura 18B). En presencia de *R. solani*, la expresión del gen *ech-42* se duplicó a las 36 h de cultivo, pero fue reprimido a las 48 y 60 h (Figura 18A). El gen *prb-1* duplicó su expresión de 36 a 48 h (Figura 18B). Sin embargo, los genes *pbs-1* y *tps-1* fueron reprimidos en presencia del fitopatógeno a las 36 y 48 h, comparados con su control en ausencia de *R. solani* (Figura 18C y D).

En presencia de TSA, el gen *ech-42* mantuvo su expresión a las 36 y 48 h; sin embargo, fue ligeramente inducido después de 60 h (Figura 18E). El gen *pbs-1* fue reprimido en presencia de TSA a las 60 h (Figura 18G); donde la expresión de *prb-1* fue reprimida a las 48 y 60 h (Figura 18F); y el gen *tps-1* fue reprimido a las 36 y 48 h (Figura 18H). La presencia de ambos, el fitopatógeno y la TSA, llevaron a la sobreexpresión de *ech-42* y *pbs-1* a las 36 y 48 h (Figura 18E y G). Los genes *prb-1* y *tps-1* fueron sobreexpresadas ligeramente en presencia de TSA y *R. solani* después de 48 h, y reprimidos a las 60 h (Figura 18G y H).

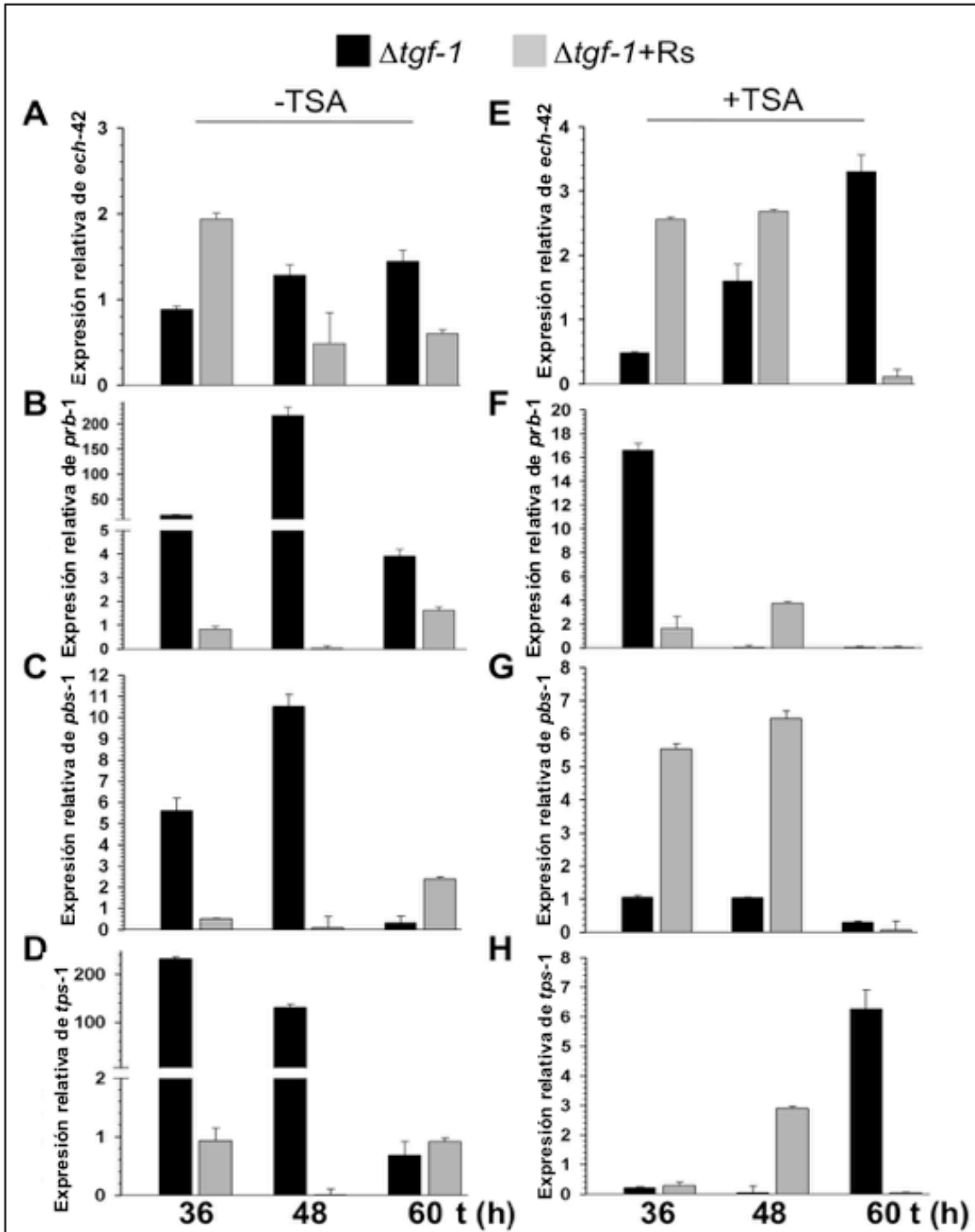


Figura 18. TGF-1 y TSA regulan diferencialmente la expresión de los genes *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* en *T. atroviride*.

Confrontaciones de *T. atroviride* mutante $\Delta tgf-1$ contra *R. solani*, creciendo en agar PDA en ausencia (A, B, C, D) y presencia de TSA 300 nM (E, F, G, H) a 28 °C. Fueron analizadas a 36, 48 y 60 h. La expresión relativa fue calibrada con el gen *act-1* como

control interno y normalizada contra la cepa silvestre en la ausencia del fitopatógeno. *ech-42* = gen endoquitinasa de 42-kDa, *prb-1* = gen de proteinasa, *pbs-1*= gen de peptaibol sintasa, and *tps-1* = gene terpeno sintasa. Barras negras= cepa de *T. atroviride* mutante $\Delta tgf-1$ creciendo sola, barras grises= cepa de *T. atroviride* mutante $\Delta tgf-1$ vs *R. solani*.

DISCUSIÓN

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* son ampliamente usadas como ACB contra hongos fitopatógenos que afectan negativamente cultivos de importancia agroeconómica (Howell, 2003). *Trichoderma* spp. posee diferentes mecanismos para antagonizar a los hongos fitopatógenos; entre ellos, la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo y la producción de metabolitos antimicrobianos; así como, la inducción de la respuesta sistémica en las plantas (Shores *et al.*, 2010; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

En este trabajo, analizamos el efecto de TSA, un inhibidor de HDAC clase I y II en el mecanismo de biocontrol de *T. atroviride* contra el fitopatógeno *R. solani*. La adición de TSA al medio de cultivo afectó ligeramente el crecimiento de ambas cepas (*T. atroviride* y *R. solani*); sin embargo, en *T. atroviride* no se afectó su capacidad de sobrecrecer a *R. solani*, comparado con el control en ausencia de TSA. Se ha estudiado, que la adición de TSA al medio de crecimiento, además de inhibir las HDACs, también incrementa la actividad antimicrobiana de un gran número de hongos contra bacterias facultativas y hongos patógenos, porque estimula la producción de metabolitos secundarios (Zutz *et al.*, 2014).

Probablemente, la ligera disminución en el crecimiento de las cepas se debió a que la presencia de TSA afectó negativamente a ambas, ya que es un compuesto antifúngico *per se* (Tsuji *et al.*, 1975). Por ejemplo, en *A. fumigatus* se observó retraso en la germinación y defectos en el crecimiento y conidiación, cuando fue crecida en presencia de TSA en el medio de cultivo (Bauer *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha observado que la cepa sobreproductora de gliovirina de *T. virens*, crece más lento que la cepa silvestre (Howell y Stipanovic, 1995).

La adición de TSA al medio de cultivo disminuyó el crecimiento de *F. Oxysporum* y *B. cinerea*, al igual que con *R. solani*; en contraste, el crecimiento de *S. rolfsii* se vió ligeramente favorecido. Mientras que en presencia del FLM de *T. atroviride*, los

cuatro fitopatógenos disminuyeron ligeramente su crecimiento. Indicando que la respuesta antagónica-antibiótica de *T. atroviride* puede ser específica para cada patógeno. Respecto a esto, se ha observado que la señalización y la respuesta micoparasítica depende del huésped (Daguerre *et al.*, 2014; Vos *et al.*, 2015; Parmar *et al.*, 2015). Por ejemplo en *T. virens*, las mutantes de $\Delta tga1$ (subunidad α de la proteína G) de *T. atroviride*, pierden la actividad micoparasítica contra *R. solani*, *B. cinerea* y *S. rolfisii* en confrontaciones directas (Rocha-Ramirez *et al.*, 2002). Pero la formación de estructuras de infección no es afectada. Además la secreción de 6PP y metabolitos antifúngicos derivados del sesquiterpeno es reducida, pero los metabolitos antifúngicos de bajo peso molecular son sobreproducidos (Reithner *et al.*, 2005). Esto puede indicarnos el porqué de la variación del crecimiento en las cepas de los hongos fitopatógenos, en los ensayos de antibiosis de *T. atroviride*.

Se sabe que los hongos son excelentes productores de muchos compuestos a partir de su metabolismo secundario, como antibióticos, moléculas que regulan el crecimiento de las plantas, toxinas, etc. Además, que los genes que codifican para proteínas del metabolismo secundario, se encuentran agrupados en clusters localizados en regiones silenciadas transcripcionalmente (Keller *et al.*, 2005; Brakhage, 2013). Nuestros resultados muestran, que la adición de TSA al medio de crecimiento de *T. atroviride*, aumentó su habilidad para inhibir el crecimiento de *R. solani*. Un ejemplo a este respecto, es un estudio donde usaron inhibidores de HDACs, como la TSA, y encontraron una reducción en la adherencia de *Candida albicans* a neumocitos cultivados; así como una significativa reducción en el porcentaje de tubos germinales formados después de 2h de tratamiento con el inhibidor, afectando su patogenicidad (Simonetti *et al.*, 2007). Esto sugiere, que la inhibición de HDACs I y II, como Rpd3p y Hda1p, aumenta la producción de metabolitos antimicrobianos en *T. atroviride*, probablemente incrementando la acetilación de las histonas en las regiones promotoras de genes relacionados al metabolismo secundario, como los antibióticos (Graessle *et al.*, 2001; Ruijter *et al.*, 2003).

Otro ejemplo, es el gen de la desacetilasa *HDC1*, homólogo del gen *HOS2* (HDAC) de *S. cerevisiae*, el cual, es requerido para la total virulencia del hongo *Cochliobolus carbonum* en plantas maíz (Baidyaroy *et al.*, 2001). Un análisis genómico de tres cepas de *Trichoderma*, mostró que *T. virens*, *T. reesei* y *T. atroviride* contienen genes ortólogos a Rpd3p (ID163610), Hda1p (ID39952), Hos2p (212638); los cuales son sensibles a TSA (Schmoll *et al.*, 2016). En este trabajo, la adición de TSA al medio de crecimiento, posiblemente permite la desrepresión en los genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios de *T. atroviride*.

Los resultados del análisis de la expresión de genes relacionados a micoparasitismo como *ech-42*, *prb-1* y genes relacionados a la antibiosis, como *pbs-1* (involucrada en la síntesis de terpenos) y *tps-1* (peptaibol sintetasa), mostraron que la presencia de *R. solani* indujo la transcripción de *ech-42* y *prb-1*, los cuales ya han sido previamente descritos (Carsolio *et al.*, 1994; Geremia *et al.*, 1993). Así como también indujo la expresión de *tps-1*, pero reprimió la transcripción de *pbs-1* en presencia del fitopatógeno. La represión en *pbs-1* pudiera deberse a que *R. solani* está tratando de bloquear la producción de peptaiboles de *T. atroviride* a través de alguna molécula efectora. Respecto a esto, se sabe que una fuerte comunicación cruzada se da entre los parásitos y los huéspedes para contrarrestarse unos a otros por medio de enzimas hidrolíticas y moléculas efectoras. Se ha reportado que *R. solani* también produce compuestos antimicrobianos (Ma *et al.*, 2004; Muhsin y Selman, 2013). En un estudio, se reportó que la presencia de *R. solani* es importante para la producción y liberación de 6PP por *T. harzianum* (Serrano-Carreón *et al.*, 2004). Las plantas son otro ejemplo de esta comunicación cruzada, ya que cuando están infectadas por hongos, secretan enzimas como proteasas, quitinasas y glucanasas que afecten la pared celular del patógeno (van Loon *et al.*, 2006). De igual manera, *Trichoderma* secreta enzimas hidrolíticas dirigidas a la pared celular de plantas y hongos para establecer una relación benéfica o parasítica, respectivamente (Moran-Diez *et al.*, 2009; Hermosa *et al.*, 2012; Olmedo-Monfil y Casa-Flores, 2014).

En este trabajo, observamos que la adición de TSA en el medio de crecimiento afectó positivamente la expresión de todos los genes *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1*. Indicando que la presencia de TSA, pudiera estar inhibiendo HDACs como Rpd3 o Hda1; lo cual permite la hiperacetilación de las histonas en regiones de la cromatina silenciadas como ha sido reportado para clusters de metabolismo secundario (Shwab *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). Esto está asociado con una expresión génica aumentada (Ekwall *et al.*, 1997). Por lo que, cambios en la expresión de los genes, que pueden afectar la biología de los organismos; tales como la virulencia y la patogenicidad (Isakov *et al.*, 2008; Klar *et al.*, 2001).

Además, la expresión de los cuatro genes fue reprimida por la presencia de TSA y *R. Solani*, lo cual puede indicar un efecto positivo de TSA en la síntesis de alguna molécula inductora de *R. solani*, afectando la respuesta de *T. atroviride* y la expresión de sus genes. Otra posible explicación es que la presencia de TSA y el fitopatógeno, pero no cada uno de ellos, aumentan la expresión de un regulador negativo de genes de micoparasitismo y/o antibiosis en *T. atroviride*. El concepto general, es que las HDACs están asociadas con la represión transcripcional de manera directa. Sin embargo, se han reportado trabajos en los cuales la represión de la actividad de HDAC (a través de mutaciones o inhibidores) causa desregulación de la expresión génica posiblemente de manera indirecta (Brosch *et al.*, 2008; Osorio-Concepción *et al.*, 2016). Por ejemplo, la eliminación de Hos2 en *S. cerevisiae*, permite la hiperacetilación de las histonas H3 y H4 en la región codificante de genes activos y causa defectos en la activación transcripcional (Wang *et al.*, 2002).

Con la finalidad de entender un poco más la participación de la acetilación de histonas en el micoparasitismo, analizamos la cepa mutante *tgf-1* de *T. atroviride* en ensayos de cultivos duales. La cepa Δ *tgf-1* fue capaz de enrollarse en la hifa de *R. solani*, pero fue incapaz de sobrecrecerlo. Esto sugiere que la HAT TGF-1 no está involucrada en la capacidad de enrollarse de *T. atroviride*; pero la velocidad

de crecimiento reducida de $\Delta tgf-1$ puede estar afectando su capacidad para antagonizar al fitopatógeno. Probablemente, esto se debe a que la velocidad de crecimiento de $\Delta tgf-1$ es un factor importante para la competencia de *T. atroviride*. Summerbell (1987), reportó que la capacidad de inhibición del crecimiento de un huésped es directamente proporcional a la velocidad de crecimiento de *Trichoderma*.

El hecho de que $\Delta tgf-1$ sea sobre crecida por otras cepas de *Trichoderma*, y que algunas de ellas incluyendo la silvestre, muestren una zona de lisis muy marcada; podría deberse a el lento crecimiento de la cepa $\Delta tgf-1$. Lo cual, disminuye su capacidad para competir con otras especies de *Trichoderma*; por otro lado, la cepa $\Delta tgf-1$ muestra una aumentada producción de antibióticos, que le puede permitir lisar las hifas de las otras cepas de *Trichoderma*, incluyendo la silvestre (Reaves y Crawford, 1994).

El análisis antimicrobiano de FLM de la cepa $\Delta tgf-1$, junto con los cultivos duales contra *R. solani* mostraron un aumento en la inhibición en el crecimiento de *R. solani* comparado con el FLM de la cepa silvestre. Lo cual indicó un papel negativo de TGF-1 en la síntesis de compuestos antimicrobianos en *T. atroviride*. Se ha reportado, que ortólogos de TGF-1 en otros organismos, también regulan negativamente la expresión génica. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, la respuesta de adaptación a estrés requiere la actividad de Gcn5 para la activación o represión de genes que están físicamente asociados con esta proteína. Esto provee evidencia para un proponer un papel de Gcn5 como co-activador y co-represor (Xue-Franzén *et al.*, 2010). Además, en *N. crassa* y *T. atroviride*, se observó que sus ortólogos a la HAT Gcn5 regulan positivamente genes de fotoinducción, pero negativamente la expresión del gen *al-3* en obscuridad (Uresti-Rivera *et al.*, en preparación).

La adición de TSA al medio de crecimiento de $\Delta tgf-1$ revirtió el efecto de ausencia de TGF-1 en los ensayos de antibiosis contra *R. solani*; lo que sugiere que la

acetilación inducida por la TSA es suficiente para revertir el efecto de la pérdida de *tgf-1*, y probablemente su producto regule elementos negativos. Por ejemplo, se ha observado que la presencia de TSA rescata el fenotipo de mutantes HAT en células HeLa y en *S. cerevisiae* (Taipale *et al.*, 2005; Choy *et al.*, 2002).

Por otro lado, el análisis antimicrobiano de la mutante Δ *tgf-1* de *T. atroviride* contra *S. rolfsii*, *B. cinerea* o *F. oxysporum*, mostró una disminución en su capacidad para antagonizar a los fitopatógenos, caso contrario cuando antagonizó a *R. solani*; indicando que la HAT TGF-1 es necesaria para poder antagonizar a *S. rolfsii*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* por medio de la producción de antibióticos de manera efectiva. En *T. virens*, se observó que la mutante Δ *tgaA* mostró una habilidad reducida para antagonizar a *S. rolfsii* pero no a *R. solani*, sugiriendo vías de señalización huésped-específicas (Mukherjee *et al.*, 2004). En *T. harzianum*, mutantes de *hog1* mostraron una fuerte disminución de su actividad antagónica contra *Phoma betae* y *Colletotrichum acutatum*; sin diferencia en su capacidad antagónica con la cepa silvestre contra *B. cinerea*, *R. solani* y *S. sclerotiorum* (Delgado-Jarana *et al.*, 2006). Estos resultados pueden sugerirnos que la HAT TGF-1 localizada en los promotores de genes involucrados en la síntesis de antibióticos podrían estar participando en la regulación transcripcional de este tipo de genes en *T. atroviride*.

Nuestros resultados de las actividades enzimáticas indican que TGF-1 es un regulador negativo de las proteínas degradadoras de quitina, pero no de aquellas que degradan proteínas. Dado que la actividad de quitinasa es constitutiva en la cepa mutante Δ *tgf-1* comparada con la silvestre. Estos resultados junto con los de antibiosis contra *R. solani* pueden explicar en parte, la inhibición de crecimiento aumentada que presenta la mutante Δ *tgf-1* sobre el patógeno comparada con su control, puesto que *Trichoderma* posee un sistema quitinolítico complejo (Herrera-Estrella y Chet, 1999). En este sentido, se sabe que las cepas de *Trichoderma* sobreexpresantes de *ech-42* o *prb-1* proveen mayor protección contra fitopatógenos (Carsolio *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 1997; Szekeres *et al.*, 2004).

El análisis de expresión de los genes relacionados a micoparasitismo y antibiosis en la cepa mutante *tgf-1*, mostraron que posiblemente el producto de *tgf-1* regule negativamente la expresión de *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* en ausencia de *R. solani*; ya que todos los genes fueron expresados en todos los tiempos ensayados. En base a esto, podemos proponer TGF-1 podría ser un represor directo a través de su actividad HAT. O podría participar también como un represor indirecto de estos genes, acetilando el promotor de un gen que codifique para un regulador negativo; otra posible explicación, es a través de otra HAT que este acetilando de manera específica o inespecífica. A este respecto, se ha reportado que las HATs Sas3 y Gcn5 son reclutadas a genes similares (Rosaleny *et al.*, 2007). Por otro lado, un ejemplo del rol negativo de Gcn5, es el gen *FLO8* bajo condición de estrés en *S. cerevisiae* (Xue-Franxén *et al.*, 2010). Otro ejemplo, es que Gcn5 es requerido para la represión de *ARG1* en medio rico donde la expresión no es necesaria, pero el papel de Gcn5p cambia en medio mínimo, donde es requerida para la inducción de *ARG1* (Ricci *et al.*, 2002).

En los cultivos duales de Δ *tgf-1* contra *R. solani*, mostró que la expresión de los genes analizados en la cepa mutante fue completamente reprimida en todos los tiempos. Una posible explicación es que TGF-1 es necesaria para mantener la homeostasis con las moléculas efectoras producidas por *R. solani*, lo cual en el fondo mutante favorece la represión de los genes de *Trichoderma*. Estos resultados indican que TGF-1 es requerida para la inducción de los cuatro genes en presencia del fitopatógeno o para contrarrestar el efecto negativo de *R. solani* en *T. atroviride*. La excepción en la expresión de los genes ensayados fueron *ech-42* y *pbs-1*. Probablemente, la inducción de estos genes en estas condiciones, sea debido a la actividad de otras HATs presentes en *T. atroviride*, como SAS3 (ID223094; Schmoll *et al.*, 2016); las cuales pueden tener roles sobrelapados con Gcn5p como en *S. cerevisiae* (Howe *et al.*, 2001).

La adición de TSA al medio de cultivo indujo la expresión de todos los genes analizados en *Δtgf-1*, pero en diferentes tiempos comparados con el control, probablemente como resultado de la acetilación de histonas o puede ser compensado por otras HATs en ausencia de TGF-1. La adición de TSA en presencia de *R. solani* indujo la transcripción de *ech-42* y *pbs-1*, los cuales fueron reprimidos a las 60 h de co-cultivo. Sin embargo, los genes *prb-1* y *tps-1* fueron reprimidos. Una posible explicación, es que la presencia de *R. solani* no es suficiente para la completa represión de los cuatro genes a tiempos tempranos como sucedió en la confrontación con la cepa wt en presencia de TSA y pueda deberse a un retraso por la ausencia de TGF-1.

CONCLUSIONES

La presencia del inhibidor de desacetilasas de histonas TSA:

No afecta el sobrecrecimiento de *T. atroviride* sobre *R. solani*.

Aumenta el efecto antibiótico de *T. atroviride* en el crecimiento de *R. solani*.

Induce la expresión de los genes *ech-42*, *prb-1*, *pbs* y *tps-1* en ausencia del fitopatógeno.

Regula negativamente la expresión génica de *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* en presencia del fitopatógeno *R. solani*.

La ausencia del gen *tgf-1*:

No afecta la capacidad micoparasítica de *T. atroviride* contra *R. solani*.

Aumenta la capacidad de inhibición del crecimiento del FLM de *T. atroviride* contra *R. solani*.

Permite que *T. atroviride* presente actividad quitiniofítica constitutiva, pero actividad proteolítica inducible.

Regula negativamente la expresión de *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* en ausencia del fitopatógeno.

TGF-1 es necesaria para la inducción de *ech-42*, *prb-1*, *pbs-1* y *tps-1* en presencia *R. solani*.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron establecer la participación de TGF-1 y la acetilación de las histonas como reguladores transcripcionales de genes relacionados con el micoparasitismo y el metabolismo secundario de *T. atroviride*. Un estudio futuro enfocado en la interacción y balance de acetilación entre HATs/HDACs; mediante ensayos de CHIP, CHIP on CHIP, podría determinar si la regulación por TGF-1 es, como activador o represor directo o indirecto e identificar la HDAC que participa en el proceso.

ANEXOS

Anexo 1. Artículos Publicados

1. Gómez Rodríguez, Elida Yazmín, Edith Elena Uresti Rivera, Olga Araceli Patrón Soberano, María Auxiliadora Islas Osuna, Alberto Flores Martínez, Lina Riego Ruiz, María Teresa Rosales Saavedra, and Sergio Casas Flores. 2018. **“Histone acetyltransferase TGF-1 regulates Trichoderma atroviride secondary metabolism and mycoparasitism”**. PLOS ONE, en revisión. doi:

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193872>

2. Schmoll, Monika, Christoph Dattenböck, Nohemí Carreras Villaseñor, Artemio Mendoza Mendoza, Doris Tisch, Mario Ivan Alemán, Scott E. Baker, Christopher Brown, Mayte Guadalupe Cervantes Badillo, José Cetz Chel, Gema Rosa Cristobal Mondragon, Luis Delaye, Edgardo Ulises Esquivel Naranjo, Alexa Frischmann, Jose de Jesus Gallardo Negrete, Monica García Esquivel, Elida Yazmín Gómez Rodríguez, David R. Greenwood, Miguel Hernández Oñate, Joanna S. Kruszezwska, Robert Lawry, Hector M. Mora Montes, Tania Muñoz Centeno, Maria Fernanda Nieto Jacobo, Guillermo Nogueira Lopez, Vianey Olmedo Monfil, Macario Osorio Concepcion, Sebastian Piłsyk, Kyle Pomraning, Aroa Rodriguez Iglesias, Maria Teresa Rosales Saavedra, J. Alejandro Sánchez Arreguín, Verena Seidl Seiboth, Alison Stewart, Edith Elena Uresti Rivera, Chih-Li Wang, Ting Fang Wang, Susanne Zeilinger, Sergio Casas Flores, and Alfredo Herrera Estrella. 2016. **“The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three Trichoderma Species”**. Microbiology and Molecular Biology. Vol. 80: 205–327. doi: 10.1128/MMBR.00040-15.

DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-15>

3. Kubicek, Christian P. Alfredo Herrera Estrella, Verena Seidl Seiboth, Diego A. Martinez, Irina S. Druzhinina, Michael Thon, Susanne Zeilinger, Sergio Casas Flores, Benjamin A. Horwitz, Prasun K. Mukherjee, Mala Mukherjee, László Kredics, Luis D. Alcaraz, Andrea Aerts, Zsuzsanna Antal, Lea Atanasova, Mayte G. Cervantes Badillo, Jean Challacombe, Olga Chertkov, Kevin McCluskey, Fanny Couplier, Nandan Deshpande, Hans von Döhren, Daniel J. Ebole, Edgardo U. Esquivel Naranjo, Erzsébet Fekete, Michel Flippi, Fabian Glaser, Elida Y. Gómez Rodríguez, Sabine Gruber, Cliff Han, Bernard Henrissat, Rosa Hermosa, Miguel Hernández Oñate, Levente Karaffa, Idit Kost, Stéphane Le Crom, Erika Lindquist, Susan Lucas, Mette Lübeck, Peter S Lübeck, Antoine Margeot, Benjamin Metz, Monica Misra,

Helena Nevalainen, Markus Omann, Nicolle Packer, Giancarlo Perrone, Edith E Uresti Rivera, Asaf Salamov, Monika Schmoll, Bernhard Seiboth, Harris Shapiro, Serenella Sukno, Juan Antonio Tamayo Ramos, Doris Tisch, Aric Wiest, Heather H Wilkinson, Michael Zhang, Pedro M. Coutinho, Charles M. Kenerley, Enrique Monte, Scott E. Baker, and Igor V. Grigoriev. 2011. **“Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma”**. Genome Biology. Vol. 12: R40. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r40.

DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>

4. Uresti Rivera, Edith Elena, Mayte Guadalupe Cervantes Badillo, Tania Muñoz Centeno, Yazmín Hernández Díaz, Elida Yazmín Gómez Rodríguez, Sergio Casas Flores. 2018. **“The histone acetyltransferase TGF-1 is a coactivator of blue light-responsive genes in Trichoderma atroviride”**. En preparación.

DOI:

5. Casas Flores, Sergio, Elida Yazmín Gómez Rodríguez, and J. Viridiana García Meza. 2015. **“Community of thermoacidophilic and arsenic resistant microorganisms isolated from a deep profile of mine heaps”**. AMB Express. Vol. 5: 54. doi: 10.1186/s13568-015-0132-5.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0132-5>

Anexo 2. Oligonucleótidos usados en este estudio

| Nombre del gen | *JGI Protein ID | Secuencia del oligonucleótido (5' to 3') | Nombre del oligo nucleótido | Tamaño del producto (bp) |
|---------------------------|-----------------|---|-----------------------------|--------------------------|
| <i>ech-42^a</i> | 176466 | atgtgggcttcctcgaaaatcc ccaggtctgaggctggaagt | Ech-42 fw Ech-42 Rv | 237 |
| <i>prb-1^a</i> | 268415 | atgaccagcattcgtcgtctcgct gcagtgctacgcttggtcaacga | Prb-1 fw Prb-1 Rv | 206 |
| <i>pbs-1^c</i> | 317938 | ccgagacaagcgtcaagga cgctctgcgcatgggt | Pbs-1 fw Pbs-1 Rv | 152 |
| <i>tps-1^c</i> | 31441 | ccatggtgagctccttctcaa cgacggtgacttgctaacg | Tps-1 fw Tps-1 Rv | 150 |
| <i>act-1^b</i> | 297070 | tcaccgaggccccatcaacc cgaccggaagcgtacagggacaga | Act fw Act Rv | 127 |

*JGI, Joint Genome Institute

^a Oligos diseñados por Aída Araceli Rodríguez Hernández (Tesis de Maestría, IPICYT)

^b Oligos diseñados por Edith Elena Uresti Rivera (Tesis de Maestría, IPICYT)

^c Oligos diseñados por Elida Yazmín Gómez Rodríguez (En este trabajo, se hizo una investigación en www.jgi.doe.gov/, para terpeno ciclasa (protein ID: 31441, de *T. virens* Vir4/Ciclasa DQ456846, reportada por Mukherjee *et al.*, 2006; y para peptaibol sintetasa de *T. virens* tex1/NRPS AAM78457, reportada por Wiest *et al.*, 2002). Y con estas secuencias se identificaron las secuencias en *T. atroviride* y se diseñaron los oligos.

Anexo 3. Figuras suplementarias.

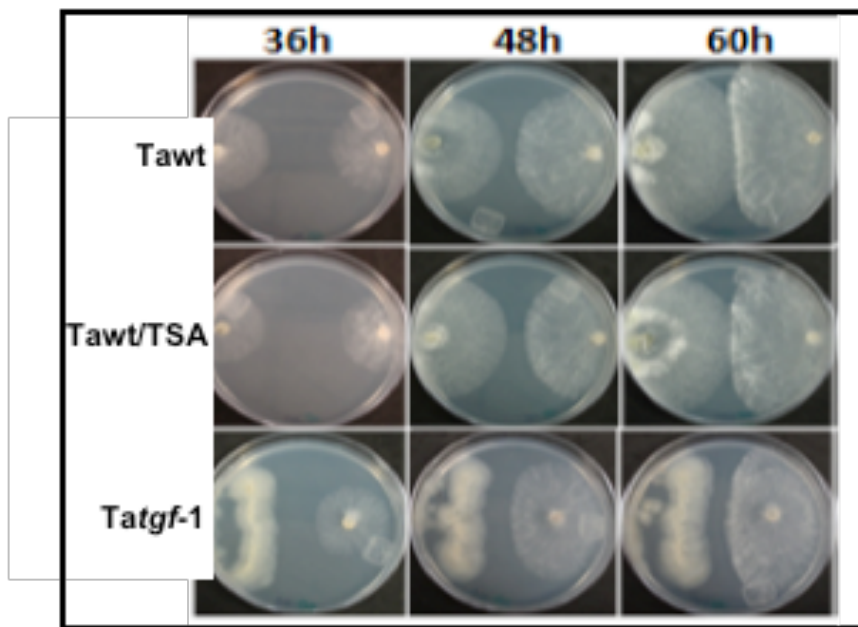


Figura S1. Ensayos de cultivos duales de las cepas *T. atroviride* wt y Δ tgf-1 contra *R. solani*. Se inocularon las cepas silvestre de *T. atroviride* y Δ tgf-1 del lado izquierdo de la caja de Petri y la cepa de *R. solani* del lado derecho. Tawt= *T. atroviride* cepa silvestre, Tawt/TSA= *T. atroviride* cepa silvestre + TSA, Tatgf-1 = *T. atroviride* cepa mutante Δ tgf-1. Las fotos fueron tomadas a las 36, 48 y 60, h de crecimiento en PDA, antes y hasta contacto físico de las cepas. Las cajas de Petri fueron crecidas a 28°C.

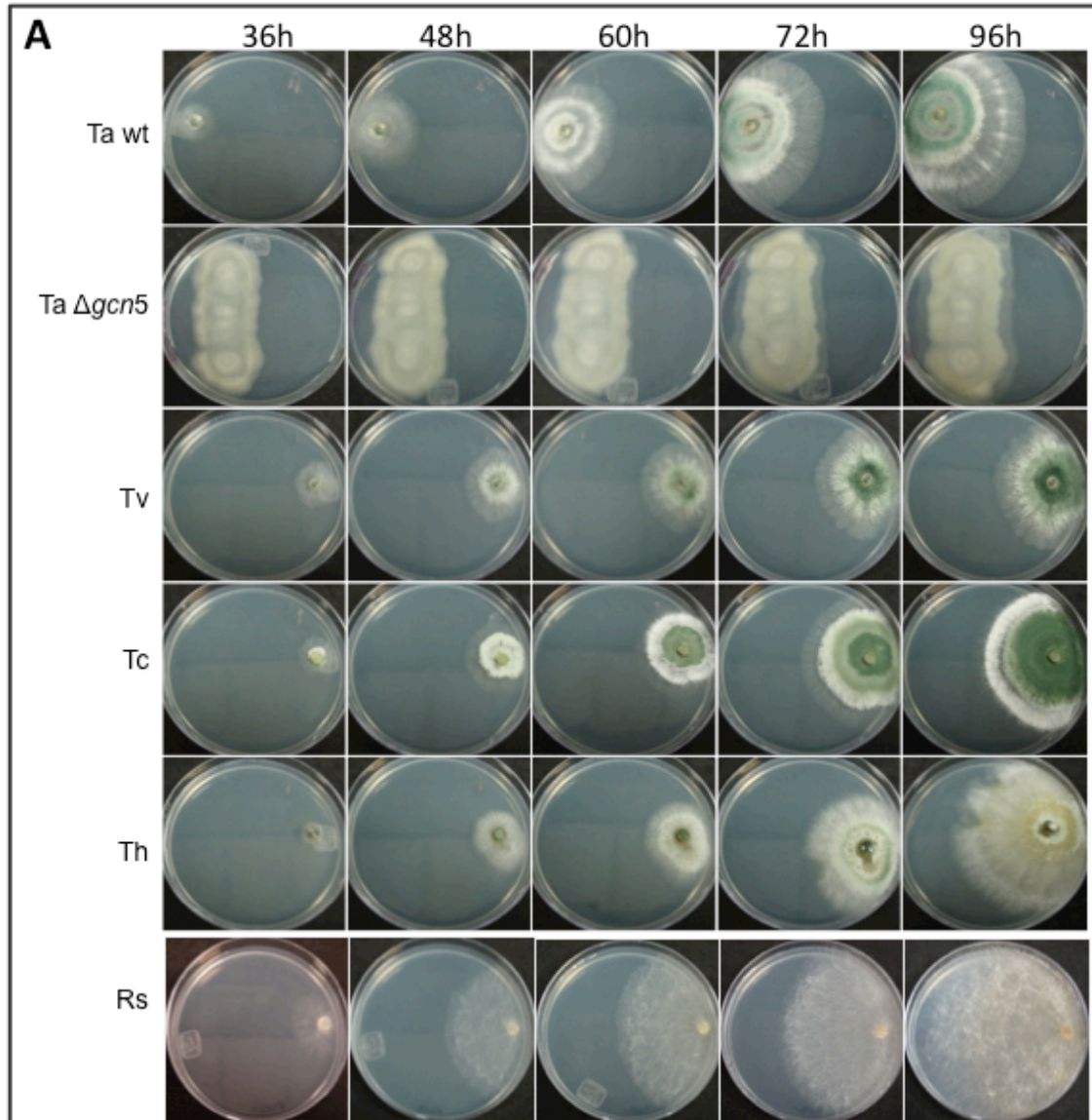


Figura S2. Cepas creciendo solas como controles. Ta wt= *T. atroviride* cepa silvestre, Ta $\Delta gcn5$ = *T. atroviride* cepa mutante $\Delta gcn5$, Tv= *T. virens*, Tc= *T. citrinoviride*, Th= *T. harzianum* y Rs= *R. solani*. Las fotos fueron tomadas a las 36, 48, 60, 72 y 96 h de crecimiento en PDA. Las cajas de Petri fueron crecidas a 28°C.

REFERENCIAS

- Abbas, A., Jiang, D. y Fu, Y.** (2017). *Trichoderma* Spp. as Antagonist of *Rhizoctonia solani*. *J. Plant. Pathol. Microbiol.* 8,3.
- Adams, D.** (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiol.* 150, 2029-2035.
- Andersen, M.R., Nielsen, J.B., Klitgaard, A., Petersen, L.M., Zachariasen, M., Hansen, T.J, Blicher, L.H., Gotfredsen, C.H., Larsen, T.O., Nielsen, K.F.** (2013). Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:E99-E107.
- Atanasova, A., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C.P. y Druzhinina, I.S.** (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genom.* 14,121.
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P.S., Ikotum, T., Sikora, R.A., Cotty, P.J. y Bandyopadhyay, R.** (2008). Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives & Contaminants: Part A.*, 25, 1266-1273.
- Baidyaroy, D., Brosch, G., Ahn, J., Graessle, S., Wegener, S., Tonukari, N.J., Caballero, O., Loidl, P. y Walton, J.D.** (2001). A gene related to Yeast *HOS2* histone deacetylase affects extracellular depolymerase expression and virulence in a plant pathogenic fungus. *Plant. Cell.* 13, 1609-1624
- Bansal, R. y Mukherjee, P.K.** (2016). Identification of novel gene cluster for secondary metabolism in *Trichoderma* genomes. *Microbiol.* 85, 185.
- Bauer, I., Varadarajan, D., Pidroni, A., Gross, S., Vergelner, S., Faber, B., Hermann, M., Tribus, M., Brosch, G. y Graessle, S.** (2016). A class 1 histone deacetylase with potential as an antifungal target. *Am. Soc. Microbiol.* 7, 6.
- Beld, J., Sonnenschein, E.C., Vickery, C.R., Noel, J.P. y Burkart, M.D.** (2014). The Phosphopantetheinyl Transferases: Catalysis of a Posttranslational Modification Crucial for Life. *Natural Product Reports*, 31, 61–108.
- Benitez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. y Codón, A.C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Internat. Microbiol.* 7, 249-260.

- Bjerling, P., Silverstein, R.A., Thon, G., Caudy, A., Grewal, S. y Ekwall, K.** (2002). Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2170-2181.
- Boheim, G.** (1974). Statistical analysis of alamethicin channels in Black lipid membranes. *J. Membr. Biol.* 19, 277-303.
- Brakhage, A.A.** (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 21-32.
- Brosch, G., Loidl, P. y Graessle, S.** (2008). Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 409-439.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. y Allis, C.D.** (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851
- Brunner, K., Omann, M., Pucher, M.E., Delic, M., Lehner, S.M., Domnanich, P., Kratochwill, K., Druzhinina, I., Denk, D. y Zeilinger S.** (2008). *Trichoderma* G protein-coupled receptors: functional characterization of a cAMP receptor-like protein from *Trichoderma virens*. *Curr. Genet.* 54, 283-299
- Cardoza, R.E., Hermosa, M.R., Vizcaino, J.A., Sanz, L., Monte, E. y Gutierrez, S.** (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. In: Mellado-Durán E, Barredo JL (eds). *Microorganisms for industrial enzymes and biocontrol*. Research Signpost, India, p 207.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutierrez, A., Chet, I. y Herrera-Estrella, A.** (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech-42*, in mycoparasitism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 929-935.
- Carsolio, C., Gutierrez, A., Jimenez, B., Van Montagu, M. y Herrera-Estrella, A.** (1994). Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 10903-10907.
- Casas-Flores, S.** (2008). Aspectos moleculares básicos y aplicados de un hongo utilizado para el control biológico de hongos fitopatógenos [ppt]. División de

Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosí, S.L.P.

- Chen, L.L., Liu, L.J., Shi, M., Song, X.Y., Zheng, C.Y. Chen, X.L. y Zhang, Y.Z.** (2009). Characterization and gene cloning of a novel serine protease with nematocidal activity from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2. *FEMS Microbiol. Lett.* 299, 135-142.
- Chet, I., Harman, G.E. y Baker, R.** (1981). *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microb. Ecol.* 7, 29. doi:10.1007/BF02010476.
- Choy, J.S. y Kron, S.J.** (2002). NuA4 Subunit Yng2 Function in Intra S Phase DNA Damage Response NuA4 Subunit Yng2 Function in Intra S Phase DNA Damage Response. *Mol Cell Biol.* 22, 8215–8225.
- Chugh, J. K. y Wallace, B.A.** (2001). Peptaibols: models for ion channels. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 565-570.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E. y Larsen, J.** (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92.
- Cortes, C., Gutierrez, A., Olmedo, V., Inbar, J., Chet, I. y Herrera-Estrella, A.** (1998). The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Mol. Gen. Genet.* 260, 218-225.
- Cuperlovic-Culf, M. y Culf, A.S.** (2014). Role of Histone Deacetylases in Fungal Phytopathogenesis: A Review. *Internat. J. Modern Botany.* 4, 48-60.
- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V. y Steinberg, C.** (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal Biol. Rev.* 28, 97-125.
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B. y Gräfe, U.** (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J. Peptide Sci.* 9, 666-678.

- Degenkolb, Y., Gräfenhan, T., Berg, A., Nirenberg, H.I., Gams, W., y Brückner, H.** (2006). Peptaibiotics: screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chem. Biodivers.* 3, 593-610.
- Delgado-Jarana, J., Sousa, S., Gonzalez, F., Rey, M. y Llobell, A.** (2006). hHog1 controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiol.* 152, 1687-700.
- Desai, S., Reddy, M.S. y Kloepper, J.W.** (2002). Comprehensive testing of biocontrol agents. *Biological control of crop diseases*, 387-420.
- Dodd, S.L., Lieckfeldt, E. y Samuels, G.J.** (2003). *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia.* 95, 27- 40.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V. y Kubicek, C.P.** (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(10): 749-759.
- Duo-Chuan, L.** (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathol.* 161, 345-360.
- Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B.M., Cranston, G. y Allshire, R.C.** (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell.* 91, 1021–1032.
- Elad, Y.** (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 10, 2719-732.
- Elad, Y. y Kapat, A.** (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 177-189.
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman T.T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M.R., Wang, Y., Christie, A.L., West, N., Cameron, M.J., Schwartz, B., Heightman, T.D., La Thangue, N., French, C.A., Wiest, O., Kung, A.L., Knapp, S. y Bradner, J.E.** (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468, 1067–1073
- Flores, A., Chet, I. y Herrera-Estrella, A.** (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb-1*. *Curr. Genet.* 31, 30-37.

- Funkhouser, J.D. y Aronson, Jr. N.** (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol. Biol.* 7, 96. doi:10.1186/1471-2148-7-96
- Furdas, S.D., Kannan, S., Sippl, W. y Jung, M.** (2012). Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases as epigenetic tools and drug candidates. *Archiv der Pharmazie*, 345, 7-21.
- Geremia, R.A., Goldman, G.H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S.B., Van Montagu, M. y Herrera-Estrella, A.** (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb-1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 3, 603-613.
- Gilardi, G., Manker, D.C., Garibaddi, A. y Gullino, M.L.** (2008). Efficacy of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* and *Ampebmyces quisqualis* applied in combination with fungicides against powdery mildew of Zucchini. *J. Plant Diseases Protect.*, 115: 208-213.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., García-Wilson, E., Perkins, N.D. y Hay, R.T.** (2003). p300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol. Cell.* 11, 1043-1054.
- González-Prieto, J. M., Rosas-Quijano, R., Domínguez, A. y Ruiz-Herrera, J.** (2014). The UmGcn5 gene encoding histone acetyltransferase from *Ustilago maydis* is involved in dimorphism and virulence. *Fungal Genet.. Biol.* 71: 86-95.
- Graessle, S., Loidl, P. y Brosch, G.** (2001). Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 704-720.
- Grinyer, J., Hunt, S., McKay, M., Herbert, B.R. y Nevalainen, H.** (2005). Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* 6, 381-388.
- Grunstein, M.** (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 389, 349-352.
- Harman, G.E.** (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol.* 96, 190-194.

- Hasan, S., Gupta, G., Anand, S. y Kaur H.** (2014). Lytic Enzymes of *Trichoderma*: Their rol in Plant Defense. iJARS. ISSN: 2278-9480 Volume 3, Issue 2.
- He, H. y Lehming, N.** (2003). Global effects of histone modifications. *Brief. Funct. Genom. and Prot.* 2, 234-243.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E.** (2012). Plant- beneficial effects of *Trichoderma* and its genes. *Microbiol.* 158, 17-25.
- Herrera-Estrella, A. Y Chet, I.** (1999). Chitinases in biological control. EXS-BASEL. 87:171-84.
- Howe, L., Auston, D., Grant, P., John, S., Cook, R.G., Workman, J.L. y Pilus, L.** (2001). Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Gene. Dev.* 15, 3144-3154.
- Howell, C.R. y Stipanovic, R.D.** (1995). Mechanisms in the biocontrol *Rhizoctonia solani* induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: Antibiosis. *Phytopathol.* 85, 469-472.
- Howell, R.C.** (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological control of Plants diseases: the History and Evolution of current Concepts. *Plant Dis.* 87, 1-10.
- Imohf, A.** (2003). Histone Modifications: An Assembly Line for Active Chromatin?. *Curr. Biol.* 13, R22-R24.
- Inbar, J. y Chet, I.** (1992). Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J. Bacteriol.* 174, 1055-1059.
- Isakov, E., Siman-Tov, R., Weber, C., Guillen, N. y Ankri, S.** (2008). Trichostatin A regulates peroxiredoxin expression and virulence of the parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 158, 82-94.
- Islam, A., Turner, E.L., Menzel, J., Malo, M.E. y Harkness, T.A.A.** (2011). Antagonistic Gcn5-Hda1 interactions revealed by mutations to the Anaphase Promoting Complex in yeast. *Cell Div.* 6, 13. doi:10.1186/1747-1028-6-13
- Johnsson, A., Durand-Dubief, M., Xue-Franzén, Y., Rönnerblad, M., Ekwall, K. y Wright, A.** (2009). HAT-HDAC interplay modulates global histone H3K14 acetylation in gene-coding regions during stress. *EMBO reports.* 10, 1009-1014.

- Keller, N.P., Turner, G. y Bennett, J.W.** (2005). Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol* 3, 937-947.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B.K., Singh, S.P., y Singh, H.B.** (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 533.
- Klar, A.J.S., Srikantha, T. y Soll, D.R.** (2001). A Histone Deacetylation Inhibitor and Mutant promote colony-Type switching of the Human Pathogen *Candida albicans*. *Genetics.* 158, 919-924.
- Kleff, S., Andrulis, E.D., Anderson, C.W. y Sternglanz, R.** (1995). Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 270, 24674–24677
- Koga, D., Mitsutomi, M., Kono, M. Y Matsumiya, M.** (1999). Biochemistry of chitinases. (Birkhauser Verlag: Basel Switzerland).
- Komon-Zelazowska, M., Neuhof, T., Dieckmann, R., von Döhren, H., Herrera-Estrella, A., Kubicek, C.P. y Druzhinina, I.S.** (2007). Formation of atroviridin by *Hypocrea atroviridis* is conidiation associated and positively regulated by blue light and the G protein GNA3. *Eukaryot. Cell.* 6, 2332-2342.
- Koumoutsi, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franhe, P., Vater, J. y Borris, R.** (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloli quefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.*, 186, 1084-1096.
- Kouzarides, T.** (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* 128, 693-705.
- Kubicek, C.P. y Harman, G.E.** (eds) (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*, vols 1 and 2. Taylor & Francis Ltd, London.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L.D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M.G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Coulpier, F., Deshpande, N., von Döhren, H., Ebbole, D.J., Esquivel-Naranjo, E.U., Fekete, E., Flipphi, M., Glaser, F., Gómez-**

- Rodríguez, E.Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández-Oñate, M., Karaffa, L., Kostı, I., Le Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, P.S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E.E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno S., Tamayo-Ramos, J.A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H.H., Zhang, M., Coutinho, P.M., Kenerley, C.M., Monte, E., Baker, S.E. y Grigoriev, I.V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12, R40. doi:10.1186/gb-2011-12-4-r40
- Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M. y Druzhinina, I.S. (2008). Fungal genus *Hypocrea*/*Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 9(10), 753-763.
- Kubicek, C.P., Mach, R. L., Peterbauer, C.K. y Lorito, M. (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* 83, 11-23.
- Kullnig, C., Mach, R.L., Lorito, M. y Kubicek, C.P. (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (=T. harzianum P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech-42* gene expression before mycoparasitic contact. *App. Environ. Microbiol.* 66, 2232-2234.
- Kuo, M.-H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E.A. y Allis, C.D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Gen. Dev.* 12(5), 627–639.
- Lakshman, D.K., Natarajan, S.S., Lakshman, S., Garrett, W.M. y Dhar, A.K. (2008). Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*. *Mycol*, 100 (6), 867-875.
- Lamoth, F., Juvvadi, P.R. y Steinbach, W.J. (2015). Histone deacetylase inhibition as an alternative strategy against invasive aspergillosis. *Frontiers in Microbiol.* 8, 96.
- Ledent, V. y Vervoort, M. (2006). Comparative genomics of the class 4 histone deacetylase family indicates a complex evolutionary history. *BMC Biol.* 4, 24.

- Lee, I., Oh, J-H., Keats Shwab, E., Dagenais, T.R., Andes, D. y Keller, N.P.** (2009). Hdaa, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genet Biol* 46(10):782–790
- Legube, G. y Trouche, D.** (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO reports*. 4, 944-947.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. y Kubicek, C.** (1996). Cell wall synthesis is a mayor target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178, 6382-6385.
- Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. y Monte, E.** (2010). Translational Research on *Trichoderma*: From Ómics to the Field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 395-417.
- Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Ma, YM., Li Y., Liu JY., Song, Y.C. y Tan, R.X.** (2004). Anti-Helicobacter pylori metabolites from *Rhizoctonia sp.* Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia*. 75, 451-456.
- Marks, P.A., Richon, V.M. y Rifkind, R.A.** (2000). Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *J. Nalt. Cancer Inst.* 92, 1210-1216.
- Marra, R., Ambrosio, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S.L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turra, D., Fogliano, V., Scala, F. y Lorito, M.** (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr. Genet.* 50, 307-321.
- Martínez-Soto, D., González-Prieto, J.M. y, and Ruiz-Herrera, J.** (2015). Transcriptomic analysis of the GCN5 gene reveals mechanisms of the epigenetic regulation of virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Res.* 15(6): fov055.

- Masuda, H., Araga, C. y Yoshino, T.** (1975). Coastal fishes of southern Japan. Tokai University Press, Tokyo. 1-379, 142.
- Mathivanan, N., Prabavathy, V.R. y Vijayanandraj, V.R.** (2008). The effect of fungal secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens. Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology 14. ed. P. Karlovsky, 74543-3.
- Mavrodi, D.V., Mavrodi, O.V., McSpaddenss-Gardener, B.B., Landa, B.B., Weller, D.M. y Thomashow, L.S.** (2002). Identification of differences in genome content among pHID-positive *Pseudomonas fluorescens* strains by using PCR based subtractive hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 68, 5170-5776.
- Merrick, C.J., y Duraisingh, M.T.** (2006). Heterochromatin-mediated control of virulence gene expresión. Mol. Microbiol. 62, 612-620.
- Miller B.R. y Gulick, A.M.** (2016) Structural Biology of Nonribosomal Peptide Synthetases. In: Evans B. (eds) Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis. Methods in Molecular Biology, vol 1401. Humana Press, New York, NY.
- Moran-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R.E., Gutierrez, S., Lorito, M. y Monte, E.** (2009). The ThPG1 Endopolygalacturonase Is Required for the *Trichoderma harzianum*-Plant Beneficial Interaction. *MPMI*. 8(22) 1021-1031.
- Muhsin, T.M. y Selman, M.S.** (2013). *In vitro*, optimization of growth and bioactivity of antibacterial metabolite produced by *Rhizoctonia solani kuhn*. *J. Basrah Res.* 39, 101-111.
- Mukherjee, M., Horwitz, B.A., Sherkhane, P.D., Hadar, R. y Mukherjee, P.K.** (2006). A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens*: evidence from analysis of genes underexpressed in a mutant defective in morphogenesis and antibiotic. *Curr. Genet.* 50, 193-202.
- Mukherjee, P., Wiest, A., Ruiz, N., Keightley, A., Moran-Diez, M.E., McCluskey, K., Pouchus, Y.F. y Kenerley, C.M.** (2011). Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *J Biol. Chem.* 6, 4544-4554.

- Mukherjee, P.K., Nautiyal, C.S. y Mukhopadhyay, A.N.** (2008). Molecular Mechanisms of Biocontrol by *Trichoderma* spp. C.S. Nautiyal, P. Dion (eds.) *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Soil Biol.* 15, 243-262.
- Mukherjee, S., Berger, M.F., Jona, G., Wang, X.S., Muzzey, D., Snyder, M., Young, R.A. y Bulyk, M.L.** (2004). *Rapid analysis of the DNA-binding specificities of transcription factors with DNA microarrays.* *Nat. Genet.* 36,1331-9.
- Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A. y Hossain, K.** (2014). *Trichoderma* spp.: A Biocontrol Agent for Sustainable Management of Plant Diseases. *Pak. J. Bot.* 46, 1489-1493.
- Neissa, J.I. y Guerrero, C.** (2004). Del código genético al código epigenético: Nuevas estrategias terapéuticas. *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Colombia.* 52, 287-303.
- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Matten, D., Köning, C.C., Valiante, V., Schroeckh, V. y Brakhage, A.A.** (2015). Microbial Communications leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiol.* 6,299.
- Neuhof, T., Dieckmann, R., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. y von Döhren, H.** (2007). Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma*/Hypocrea: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? *Microbiol.* 153,3417-3437
- North, B.J. y Verdin, E.** (2004). Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Gen. Biol.* 5, 224
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M. y Verdin, E.** (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* 11, 437–444
- Nützmann, H-W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Hertweck, C., Strauss, J. y Brakhage, A.A.** (2011). Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires saga/ada-mediated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci* 108, 14282–14287

- Nützmann, H.W., Fischer, J., Scherlach, K., Hertweck, C. y Brakhage, A.A.** (2013). Distinct Amino Acids of Histone H3 Control Secondary Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *App. Environ. Microbiol.* 79, 6102-6109.
- Ogoshi, A.** (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25,125–143.
- Olmedo-Monfil, V. y Casas-Flores, S.** (2014). “Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. y their applications in agriculture”. In “*Biotechnology y Biology of Trichoderma*”, Ed V. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. Upadhyay, I. Druzhinina y M. Tuohy (Amsterdam, The Neterlands: Elsevier Press), 429-453.
- Omann, M. y Zeilinger, S.** (2010). How a mycoparasite employs G-Protein signaling: using the example of *Trichoderma*. *J. Signal. Transduct.* 2010, 123126
- Osorio-Concepción, M., Mondragón, G.R.C., Gutiérrez-Medina, B. y Casas-Flores, S.** (2016). The histone deacetylase HDA-2 regulates growth, conidiation, blue light perception and oxidative stress responses in *Trichoderma atroviride*. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM-02922.
- Page, M.J. y Di Cera, E.** (2008). Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1220-1236.
- Pakneshan, P., Szyf, M., Farias-Eisner, R. y Rabbani, S.A.** (2004). Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoters blocks breast cancer growth and metastasis. *J. Biol. Chem.* 279,31735-44.
- Parmar, H.J., Bodar, N.P., Lakhani, H.N., Patel, S.V., Umrania, V.V. y Hassan, M.M.** (2015). Production of lytic enzymes by *Trichoderma* strains during *in vitro* antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of stem rot of grounsnut. *AJMR.* 9, 365-372.
- Peserico, A. y Simone, C.** (2011). Physical and functional HAT/HDAC Interplay Regulates Protein Acetylation Balance. *J. Biomed. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1155/2011/371832>
- Phillips, D.M.** (1963). The presence of acetyl groups in histones. *Biochem. J.* 87, 258-263.

- Prieto, C.** (2016). Characterization of Nonribosomal Peptide Synthetases with NRPSsp. In: Evans B. (eds) Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis. Methods in Molecular Biology, vol 1401. Humana Press, New York, NY.
- Reaves, J.L. y Crawford, R.H.** (1994). *In vitro* colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. Res Pap PNW-RP-474. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 8p
- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R. y Collado, I.G.** (2008) Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem. Rev.* 7,89-123.
- Reithner, B., Brunner, K., Schuhmacher, R., Peissl, I., Seidl, V., Krska, R., Zeilinger, S.** (2005). The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet. Biol.* 42, 749e760.
- Ricci, A.R., Genereaux, J. y Brandl, C.J.** (2002). Components of SAGA histone acetyltransferase complex are required for repressed transcription of ARG1 in rich medium. *Mol. Cell. Biol.* 22(12), 4033-4042.
- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S.K., Wang, A., Suka, N. y Grunstein, M.** (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* 109, 437–446.
- Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B.A. y Herrera- Estrella, A.** (2002). *Trichoderma atroviride* G-protein a-subunit gene tga1 is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot. Cell.* 1, 594e605.
- Rodríguez-Hernández, A.A. (2008).** El papel de una desacetilasa de histonas ortóloga a HD1 de *A. thaliana* en la respuesta a la luz azul en *Trichoderma atroviride*. (Tesis de Maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT. San Luis Potosí, S.L.P., México.
- Rosaleny, L.E., Ruiz-García, A.B., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J.E. y Tordera, V.** (2007). The Sas3p and Gcn5p histone acetyltransferases are recruited to similar genes. *Genome Biol.* 8, R119. doi:10.1186/gb-2007-8-6-r119.

- Ruijter, A.J.M., van Gennip, A.H., Caron, H.C., Kemp, S. y van Kuilenburg, A.B.P.** (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737-749
- Salas-Marina, M.A., Isordia-Jasso, M.I., Islas-Osuna, M.A., Delgado-Sanchez, P., Jimenez-Bremont, J.F., Rodriguez-Kessler, M., Rosales-Saavedra, M.T., Herrera-Estrella, A. y Casas-Flores, S.** (2015). The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum Lycopersicum*. *Front. Plant. Sci.* doi:10.3389/fpls.2015.00077
- Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A. y Casas-Flores, S.** (2011). Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant. Pathol.* 131, 15-26.
- Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J.A., Llobell, A., Hermosa, R. y Monte, E.** (2004). Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr. Genet.* 46, 277-286.
- Scherm, B., Schmoll, M., Balmas, V., Kubicek, C.P. y Migheli, Q.** (2009). Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strain with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Curr. Genet.* 55, 81-91
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E. y Kubicek, C.P.** (1994). Parallel Formation and Synergism of Hydrolytic Enzymes and Peptaibol Antibiotics, Molecular Mechanism Involved in the Antagonistic Action of *Trichoderma harzianum* against Phytopathogenic Fungi. *App. Environ. Microbiol.* 60, 4364-4370.
- Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M.I., Baker, S.E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M.G., Cetz-Chel, J., Cristobal-Mondragon, G.R., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E.U., Frischmann, A., Gallardo-Negrete, J.J., García-Esquivel, M., Gómez-**

- Rodríguez, E.Y., Greenwood, D.R., Hernández-Oñate, M., Kruszewska, J.S., Lawry, R., Mora-Montes, H.M., Muñoz-Centeno, T., Nieto-Jacobo, M.F., Nogueira Lopez, G., Olmedo-Monfil, V., Osorio-Concepcion, M., Piłsyk, S., Pomraning, K.R., Rodriguez-Iglesias, A., Rosales-Saavedra, M.T., Sánchez-Arreguín, J.A., Seidl-Seiboth, V., Stewart, A., Uresti-Rivera, E.E., Wang, C.L., Wang, T.F., Zeilinger, S., Casas-Flores, S. y Herrera-Estrella, A.** (2016). The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 205-327.
- Schmoll, M., Seiboth, B., Druzhinina, I. y Kubicek, C.P.** (2014). 10 Genomics Analysis of Biocontrol Species and Industrial Enzyme Producers from the Genus *Trichoderma*. In: Nowrousian M. (eds) *Fungal Genomics. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, vol 13. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schuhmacher, R., Stoppacher, N. y Zeilinger, S.** (2007). Peptaibols of *Trichoderma atroviride*: screening, identification, and structure elucidation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.)
- Schuster, A. y Schmoll, M.** (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 787-799.
- Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S. y Kubicek, C.P.** (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics.* 10, 567-580.
- Serrano-Carreón, L., Flores, C., Rodríguez, B. y Galindo, E.** (2004). *Rhizoctonia solani*, an elicitor of 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum* in a two liquid phases, extractive fermentation system. *Biotechnol. Lett.* 26, 1403-1406.
- Seto, E. y Yoshida, M.** (2014). Erasers of Histone Acetylation: The Histone deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.

- Shahbazian M.D. y Grunstein, M.** (2007). Function of Site-Specific Histone Acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 75-100.
- Shoresh, M., Harman, G.E. y Mastouri, F.** (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21-43.
- Shwab, E.K., Bok, J.W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S. y Keller, N.P.** (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell* 6, 1656–1664
- Simonetti, G., Passariello, C., Rotili, D., Mai, A., Garacia, E. y Palamara, A.T.** (2007). Histone deacetylase inhibitors may reduce pathogenicity and virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 7, 1371-1380.
- Smith, K.M., Dobosy, J.R., Reifsnnyder, J.E., Rountree, M.R., Anderson, D.C., Green, G.R. y Selker, E.U.** (2010). H2B-and H3-specific histone deacetylases are required for DNA methylation in *Neurospora crassa* *Genetics* 186, 1207–1216
- Soukup A.A., Keller N.P. y Wiemann, P.** (2016) Enhancing Nonribosomal Peptide Biosynthesis in Filamentous Fungi. In: Evans B. (eds) *Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis. Methods in Molecular Biology*, vol 1401. Humana Press, New York, NY.
- Spröte, P., Hynes, M.J., Hortschansky, P., Shelest, E., Scharf, D.H, Wolke, S.M. y Brakhage, A.A.** (2008). Identification of the novel penicillin biosynthesis gene *aatB* of *Aspergillus nidulans* and its putative evolutionary relationship to this fungal secondary metabolism gene cluster. *Mol Microbiol* 70, 445–461
- Steyaert, J.M., Ridgway, H.J., Elad, Y. y Stewart, A.** (2003). Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zeal. J. Crop Hort.* 31, 281-291.
- Stoppacher, N., Reithner, B., Omann, M., Zeilinger, S., Krska, R. y Schuhmacher, R.** (2007). Profiling of trichorzianines in culture samples of *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrum.* 21, 3963-3970

- Strahl, B.D. y Allis, C.D.** (2000). The language of covalente histone modifications. *Nature*. 403, 41-45.
- Struhl, K.** (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanism. *Gene Dev.* 12, 599-606.
- Summerbell, R.C.** (1987). The Inhibitory Effect of Trichoderma Species and Other Soil Microfungi on Formation of Mycorrhiza By Laccaria-Bicolor Invitro. *New Phytol.* 105, 437–448.
- Szekeres, A., Kredics, L., Antal, Z., Kevei, F., y Manczinger, L.** (2004). Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Letters.* 233, 215-222.
- Szekeres, A., Litgeb, B., Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L. y Vagvöglyi, C.** (2005). Peptaibols and Related Peptaibiotics of *Trichoderma*. *Acta Microbiol. Et Immunol. Hungarica.* 52, 137.
- Szyf, M.** (2009). Epigenetics, DNA methylation, and Chromatin modifying drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 243-263
- Taipale, M., Rea, S., Richter, K., Vilar, A., Lichter, P., Imhof, A. y Akhtar, A.** (2005). hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 6798-810.
- Taunton, J., Hassig, C.A. y Schreiber, S.L.** (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408–411
- Tribus, M., Bauer, I., Galehr, J., Rieser, G., Trojer, P., Brosch, G. Loidl, P., Haas, H. y Graessle, S.** (2010). A novel motif in fungal class 1 histone deacetylases is essential for growth and development of *Aspergillus*. *Mol Biol Cell* 21, 345–353
- Triebel, R.C., Rojas, J.R., Sterner, D.E., Venkataramani, R.N., Wang, L., Zhou, J., Allis, C.D., Berger, S.L. y Marmorstein, R.** (1999). Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 8931-8936.

- Trojer, P.**, Brandtner, E. M., Brosch, G., Loidl, P., Galehr, J., Linzmaier, R., Haas, H., Mair, K., Tribus, M. y Graessle, S. (2003). Histone deacetylases in fungi: novel members, new Facts. *Nuc. Ac. Res.* 31, 3971-3981.
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y. y Koizumi, K.** (1975). A new antifungal antibiotic, Trichostatin. *J. Antibiot.* 29, 1-6.
- Uresti-Rivera, E.E. (2008).** Epigenética del sistema visual y del fenómeno de microparasitismo en *Trichoderma atroviride*: un análisis del gen ortólogo a GCN5. (Tesis de Maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT. San Luis Potosí, S.L.P., México.
- Uresti-Rivera, E.E., Cervantes-Badillo, M.G., Muñoz-Centeno, T., Henández-Díaz, Y., Gómez-Rodríguez, E.Y. y Casas-Flores, S.** (2016, In preparation). The histone acetyltransferase TGF-1 is a coactivator of blue light-responsive genes in *Trichoderma atroviride*. [doctoral thesis]. [San Luis Potosí (SLP, MX)]: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Van Lint, C. Emiliani, S. y Verdin, E.** (1996). The expression of a small fraction of cellular gene is change in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5, 245-254,
- van Loon, L.C., Rep, M. y Pieterse, C.M.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135-62.
- Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., López-Bucio, J. y Herrera-Estrella, A.** (2011). Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 12, 1459-1471.
- Verdin, E. y Ott, M.** (2015). 50 years of proteína acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolismo and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 258–264.
- Vidal, M., Strich, R., Esposito, R.E. y Gaber, R.F.** (1991). RPD1 (SIN3/UME4) is required for maximal activation and repression of diverse yeast genes. *Mol. Cell. Biol.* 11, 6306–6316
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M. y Sivasithamparam, K.** (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial

- Trichoderma strains active against different phytopathogens. *Letters in App. Microbiol.* 43, 143-148.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pscale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G. y Lorito, M.** (2014). Trichoderma Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycol. J.* 8, 127- 139.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. y Chet, I.** (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Leeuwenhoek.* 81: 549.
- Viterbo, A., Wiest, A., Brotman, Y., Chet, I. y Kenerley, C.** (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence response. *Mol. Plant Pathol.* 8(6), 737-746.
- Vos, C.F., De Cremer, K., Cammue, B.P.A. y De Coninck, B.** (2015). The toolbox of *Trichoderma* spp. In the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Mol. Plant Pathol.* 16, 400-412.
- Wang, A., Kurdistani, S.K., y Grunstein, M.** (2002). Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science.* 15(298), 1412-14.
- Wei, X., Yang, F. y Straney, D.C.** (2005). Multiple non-ribosomal peptide synthetase genes determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*. *Can. J. Microbiol.* 51, 423-429.
- Wen, C.M., Tseng, C.S., Cheng, C.Y. y Li, Y.K.** (2002). Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biothechnol. Appl. Biochem.* 35, 213-219.
- Whitmore, L. y Wallace, B.A.** (2004). Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vitro synthesis and channel formation. *Eur. Biophys. J.* 33,233-237.
- Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J., Bodo, B. y Kenerley, C.** (2002). Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J. Biol. Chem.* 277, 20862-20868.

- Woo, S.L., Scala, F., Rocco, M. y Lorito, M.** (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathol.* 2, 1181-185.
- Wu, M-Y. y Yu, J-H.** (2015). Epigenetics of Fungal Secondary Metabolism Related Genes. In: Zeilinger S., Martín JF., García-Estrada C. (eds) Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2. Fungal Biology. Springer, New York, NY.
- Xin, Q., Gong, Y., Lv, X., Chen, G. y Liu, W.** (2013). *Trichoderma reesei* Histone Acetyltransferase GCN5 regulates Fungal Growth, Conidiation and Cellulase Gene Expression. *Curr. Microbiol.* 67, 580-9.
- Xue-Franzén, Y., Johnsson, A., Brodin, D., Henriksson, J., Bürglin, T.R. y Wright, A.** (2010). Genome-wide characterization of the Gcn5 histone acetyltransferase in budding yeast during stress adaptation reveals evolutionarily conserved and diverged roles. *BMC Genomics.* 11, 200.
- Yoshida, M., Horinouchi, S. y Beppu, T.** (1995). Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays.* 17, 423-430.
- Zeilinger, S. y Omann, M.** (2007) *Trichoderma* biocontrol: Signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regul. and Syst. Biol.* 1, 227-234
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R. y Mukherjee, P.K.** (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biol. Rev.* 30, 74-90.
- Zutz, C., Bandian, D., Neumayer, B., Springer, F., Gorfer, M., Wagner, M., Strauss, J. y Rychli, K.** (2014). Fungi treated with small chemicals exhibit increased antimicrobial activity against facultative bacterial and yeast pathogens. *BioMed Res. Int.* doi:10.1155/2014/540292