

## **Efectos benéficos de *Trichoderma* y su regulación de la expresión génica de celulasas y hemicelulasas**

Cocet Castañeda Casasola, Yuridia Mercado Flores, Alejandro Téllez Jurado, Artemio Mendoza Mendoza, Miguel Anducho Reyes

C. Castañeda<sup>1</sup>, Y. Mercado<sup>1</sup>, A. Téllez<sup>1</sup>, A. Mendoza<sup>2</sup>, M. Anducho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Agrobiotecnología. Universidad Politécnica de Pachuca, Hidalgo, México.

<sup>2</sup>Bio-Protection Research Centre. Lincoln University, Lincoln, Nueva Zelanda.

cocet987@hotmail.com

F. Trejo, (eds.). Ciencias Biológicas y de la Salud. Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2017.

## Abstract

*Trichoderma* spp. are free-living fungi that are highly interactive in root, soil and foliar environments as well as biological control agents (Harman et al., 2004). The competence for space and nutrients, the production of toxic metabolites that prevent the colonization of phytopathogenic microorganisms and mycoparasitism based on direct antagonism of plant pathogens, are a mechanism in biocontrol (Viterbo et al., 2010). During the interaction with the roots of the plants, *Trichoderma* conferring beneficial attributions as the promotion of growth and the increase of systemic resistance, exerting effects on the development and productivity of plants (Harman, 2006).

In the early stages of colonization *Trichoderma* spp. degrades the cell wall of plants, it is constituted mainly by cellulose and hemicellulose and whose degradation is mediated by the participation of hydrolytic enzymes. The production of the enzymes necessary for the hydrolysis of the cell wall of plants is regulated at the transcriptional level by Transcription Factors, binding proteins to regulatory DNA sequences that bind to the promoters of genes that activate or repress transcription of genes involved in the synthesis of cellulase and hemicellulase enzymes.

Genetic regulation research, focused on the expression of lytic enzymes in *Trichoderma* spp. can be useful for the increase in xylanase y cellulase activity (Van Peij et al., 1998; Stricker et al., 2008) responsible for the degradation of cellulose and hemicellulose of plant biomass for the bioproduction of high-added value compounds.

## Colonización, Factor de transcripción, Enzimas hidrolíticas

### 1 Introducción

Las especies del género *Trichoderma* spp. son microorganismos de vida libre, simbioses de plantas y ampliamente utilizados como agentes de control biológico (Harman *et al.*, 2004). La competencia por espacio y nutrientes, la producción de metabolitos tóxicos que impiden la colonización de microorganismos fitopatógenos y el micoparasitismo basado en el antagonismo directo de los patógenos de las plantas, son mecanismos en el biocontrol (Viterbo et al., 2010). Durante la interacción con las raíces de las plantas, *Trichoderma* spp. confiere atribuciones benéficas entre las que destaca la promoción del crecimiento y el aumento de la resistencia sistémica, ejerciendo efectos sobre el desarrollo y productividad de las plantas (Harman, 2006).

Durante las primeras etapas de colonización *Trichoderma* spp. degrada la pared celular de las plantas, constituida principalmente por celulosa y hemicelulosa y cuya degradación esta mediada por la participación de enzimas hidrolíticas. La producción de las enzimas necesarias para la hidrólisis de la pared celular de las plantas, se ve regulada a nivel transcripcional por Factores de Transcripción, proteínas de unión a secuencias de DNA reguladoras que se unen a los promotores de genes logrando activar o reprimir la transcripción de genes involucrados en la síntesis de enzimas celulasas y hemicelulasas.

Investigaciones en regulación genética, enfocadas en la expresión de enzimas hidrolíticas de *Trichoderma* spp., logran ser de utilidad para el incremento en la actividad xilanasa y celulasa (Van Peij et al., 1998; Stricker et al., 2008) encargadas de degradar celulosa y hemicelulosa de la biomasa vegetal para la para la bioproducción de compuestos de alto valor agregado.

## 2 El Género *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycetes), son hongos filamentosos cosmopolitas, es decir, son hongos que pueden ser aislados de ecosistemas terrestres y ecosistemas acuáticos (Zhang *et al.*, 2005). En suelos, algunas especies se caracterizan por ser organismos de vida libre, oportunistas, simbioses de plantas, y micoparásitos. Además, debido a su alta capacidad reproductiva, pueden colonizar distintos ambientes, (Bissett, 1991, Harman *et al.*, 2004; Argumedo-Delira *et al.*, 2009). Su descripción morfológica y fisiológica indica que las especies del género *Trichoderma* presentan en su estado vegetativo, un micelio con septos simples, haploides y con una pared compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente mediante conidióforos hialinos ramificados organizados en fiálides simples o en grupos con conidios de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares y coloreados usualmente de verde (Martínez *et al.*, 2013).

Asimismo, presentan la capacidad de producir clamidosporas, las cuales son estructuras vitales para la su sobrevivencia en condiciones adversas (Martínez *et al.*, 2013). Son hongos aeróbicos con la capacidad de tolerar un amplio intervalo de temperaturas (McBeath & Adelman, 1991). Los valores óptimos de pH para su crecimiento se encuentran entre 5.5 a 6.5, y en algunos casos se ha reportado que para su desarrollo en suelos se requiere un 60% de humedad. La alternancia de la luz y su espectro influyen en la esporulación, pigmentación y producción de metabolitos secundarios (Wells *et al.*, 1972; Purschwitz *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2013).

## 3 Control Biológico

Las enfermedades de las plantas son un obstáculo importante para incrementar los rendimientos de diversos cultivos dando lugar a grandes pérdidas económicas. Una alternativa ambiental segura para controlar las enfermedades es el control biológico, el cual se basa en las interacciones antagónicas naturales entre los microorganismos (Viterbo *et al.*, 2010).

El uso de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico, se debe básicamente a su habilidad de reducir enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, mediante mecanismos que implican la competencia por espacio y nutrientes, antibiosis y micoparasitismo (Benhamou & Chet, 1997), logrando establecerse en la rizosfera vegetal actuando como microorganismos simbioses y oportunistas avirulentos (Harman *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010).

### 3.1 Competencia por espacio y nutrientes

La competencia por espacio y nutrientes ha sido considerada uno de los mecanismos en el biocontrol dentro del género *Trichoderma*, la cual es definida como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato y/o nutrientes), siempre y cuando la utilización por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Infante *et al.*, 2009). La ubicuidad en suelos y rápida tasa de desarrollo del género *Trichoderma*, les permite a estos hongos, competir por espacio durante la colonización de la rizósfera de plantas. Asimismo, la producción de enzimas hidrolíticas, le permiten degradar eficiente y versátilmente la materia orgánica y utilizarlos como fuente de carbono y nitrógeno, lo que permite colonizar y evitar la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat. También se ha reportado que algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de producir sideróforos, los cuales quelan los iones hierro, generando un déficit de nutrientes para otros hongos p. ej. *Botrytis cinerea* (Błaszczuk *et al.*, 2014).

Otra característica recientemente reportada en cepas de *Trichoderma harzianum*, fue la producción y actividad mejorada de hidrofobinas durante la colonización de la raíz de la planta, lo que permite la unión de filamentos miceliales a superficies de raíces hidrófobas. Además, las cepas de *Trichoderma* son resistentes a fitoalexinas, flavonoides, terpenoides y fenoles que son compuestos tóxicos producidos por las plantas en respuesta a infecciones (Blaszczyk et al., 2014).

### 3.2 Antibiosis

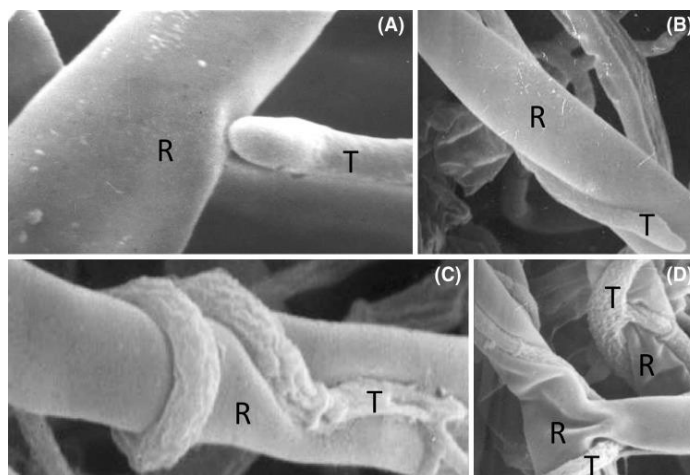
La antibiosis es el proceso basado en la inhibición del crecimiento de un organismo por el producto metabólico (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios y pequeñas moléculas tóxicas) de otro sin contacto físico. Las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden colonización por microorganismos antagónicos, actualmente se han caracterizado químicamente más de 180 metabolitos secundarios que provocan un efecto inhibitorio o letal en microorganismos fitopatógenos (Gams & Bisset 1998; Reino et al., 2008) entre estos metabolitos, se ha descrito que *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii* son productores del antibiótico volátil 6PAP (6-pentil- $\alpha$ -pirona) que inhibe el crecimiento de los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.

En el caso de los peptaiboles, estos pueden presentar actividad inhibitoria o letal hacia hongos, bacterias Gram-positivas y algunos virus y se caracterizan por ser moléculas polipeptídicas de 500-2200 Da, con extremos N-acetilados y amino-alcoholes C-terminales y abundantes en aminoácidos no proteínogénicos, particularmente ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Degenkolb et al., 2003). Los compuestos que pertenecen a esta clase incluyen tricotoxinas A y B, tricodeceninas, tricolorovinas, tricocelinas, trichorzianinas A y B, tricorzinas HA y MA, tricolonginas BI y BII, longibraquinas, atroviridinas A-C y neoatroviridinas A-D (Blaszczyk et al., 2014). Otros compuestos con propiedades antibacterianas y fungicidas incluyen a las koningininas, viridinas, dermadinas, lignoreninas y koningicinas, las cuales han sido utilizadas para el control biológico de *R. solani*, *F. oxysporum*, *Botrytis alli*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterioides fragilis* (Howell et al., 1998; Reino et al., 2008; Blaszczyk et al., 2014).

### 3.3 Micoparasitismo

El micoparasitismo producido por *Trichoderma* esta basado en el antagonismo directo de los patógenos de las plantas en el suelo o en las raíces de las plantas (Viterbo & Horwitz, 2010). El micoparasitismo ejercido por algunas de las especies de *Trichoderma*, es un proceso complejo que implica el crecimiento quimioorganotrófico sobre su huésped, mediante mecanismos de atracción, sujeción, enrollamiento y penetración de la hifa. La actividad de las enzimas líticas frecuentemente se combina con la producción de antibióticos, incrementando el nivel de antagonismo (Monte, 2001). Howell (2003), reportó que la degradación parcial de las paredes celulares en los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *F. oxysporum* por enzimas líticas facilitó la penetración más fácil de los antibióticos a las células patógenas (Blaszczyk et al., 2014).

**Figura 4.1** Micoparasitismo de *Trichoderma virens* (T) en *Rhizoctonia solani* (R). A) atracción, B) sujeción, C) enrollamiento, D) penetración de la hifa del huésped



Fuente: (Mukherjee, 2011)

#### 4 Interacciones de *Trichoderma* con otros microorganismos y plantas

Además del control biológico producido por especies de género *Trichoderma*, se sabe ahora que algunas cepas también interactúan íntimamente con las raíces de las plantas, colonizando las capas externas de la epidermis (Harman et al., 2004), obteniendo e incrementando la inmunidad de la planta contra patógenos invasores (Shoresh & Harman, 2008a, Vargas et al., 2011). La presencia de *Trichoderma* en la rizosfera establece una relación benéfica, mejorando la adecuación de las plantas en respuesta a estrés biótico y abiótico, la capacidad para colonizar las raíces mediante la interacción microorganismo-planta se asocia a numerosos efectos benéficos sobre las plantas, entre los que destaca la promoción del crecimiento y el aumento de la resistencia sistémica (Harman et al., 2004; Shoresh et al., 2010; Keswani et al., 2014).

##### 4.1 Promoción del crecimiento vegetal

*Trichoderma* spp. estimula el crecimiento y desarrollo de raíces en plantas durante su colonización, se han sugerido mecanismos basados en la adherencia, la penetración y la colonización interna de las raíces de las plantas (Hermosa et al., 2012) mediante la intervención de metabolitos tóxicos y factores de crecimiento (Hermosa et al., 2012), además posee la capacidad de solubilizar metales (zinc, magnesio, hierro o cobre) convirtiéndolos a nutrientes asimilables para la planta. El hongo produce auxinas, hormona vegetal que controla muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas lo que, a su vez, facilita la colonización e incrementa la absorción de nutrientes (Contreras-Cornejo et al., 2009; Grossmann, 2010). Al igual que las auxinas los Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs), compuestos lipófilos de bajo peso molecular han sido reconocidos como moléculas claves en la promoción del crecimiento de las plantas (Paul & Park, 2013; Garnica-Vergara et al., 2015; Lee et al., 2016).

## 4.2 Inducción de resistencia sistémica (IRS)

Las plantas están expuestas a microorganismos patógenos y simbioses. Las estrategias eficaces para detectar el peligro y crear respuestas de defensa son cruciales para la supervivencia de las plantas (Lorenzo et al., 2011). La activación de defensas de las plantas, así como el refuerzo de la pared celular y la acumulación de compuestos antimicrobianos (Chacón et al., 2007, Contreras-Cornejo et al., 2011, Salas-Marina et al., 2011) se ven reflejados, desencadenando respuestas vegetales que pueden resultar una mayor capacidad defensiva de la planta (Bailey et al., 2006, Alfano et al., 2007, Morán-Diez et al., 2012). Las plantas son resistentes a la mayoría de los microorganismos patógenos a través de la inmunidad innata, y el mecanismo de defensa sistémica (Coninck et al., 2011; Hermosa et al., 2013). Con base a las lesiones, las plantas pueden activar su resistencia de dos maneras distintas: resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR) (Zipfel, 2014). En la ISR no sólo es iniciada por los patógenos, también es inducida por la colonización de las raíces y la interacción con el sistema mutualista o microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR) (Djonovic et al., 2007).

Las primeras respuesta implican flujos de iones a través de la membrana plasmática, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la eliminación de calosa (polisacárido compuesto por residuos de glucosa unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1,3, denominado beta-glucano) (Shoresh et al., 2010). En muchos casos, el ácido salicílico o el ácido jasmónico, junto con el etileno (ET) o el óxido nitroso, inducen una cascada de eventos que conducen a la producción de una variedad de metabolitos y proteínas con funciones diversas (Hammerschmidt et al., 2001, Shoresh et al., 2010), pero también se ha demostrado que los compuestos secretados incluyendo antibióticos, biosurfactantes y compuestos orgánicos volátiles provocan resistencia sistémica.

Aunque no existe una comprensión clara del proceso de reconocimiento de plantas por *Trichoderma*, se han descrito varios inductores que pueden activar la inmunidad basal de la planta (Hermosa et al., 2013). Se conocen tres clases de compuestos producidos por cepas de *Trichoderma* que inducen resistencia en plantas. Estas moléculas son homólogos de proteínas codificadas por los genes de avirulencia (Avr4, Avr9 y LysM) (De Wit et al., 2002; Harman et al., 2004; Stergiopoulos & De Wit, 2009; De Jonge et al., 2010; Kubicek et al., 2011), oligosacáridos y/o compuestos de bajo peso molecular (peptaiboles) (Engelberth et al., 2001; Hanson & Howell, 2004; Luo et al., 2010; Hermosa et al., 2012) y proteínas con funciones enzimáticas (xilanasas, celulasas y swollenin) (Martínez et al., 2001; Brotman et al., 2008; Pieterse et al., 2009), que se liberan de las paredes celulares de hongos o plantas por actividad enzimática (Harman et al., 2004; Hermosa et al., 2013).

## 5 Regulación transcripcional de las enzimas que degradan la pared celular de las plantas

Durante la interacción de *Trichoderma* con las raíces de las plantas la producción de enzimas tiene un papel importante en la degradación de la pared celular, permitiendo el acceso del microorganismo a los tejidos vegetales (Salmond, 1994). Dicha producción es controlada por la regulación de la transcripción en *Trichoderma* spp. Esta característica regula la expresión genética, logrando la secreción de enzimas en respuesta a carbohidratos disponibles y mediados por factores de transcripción.

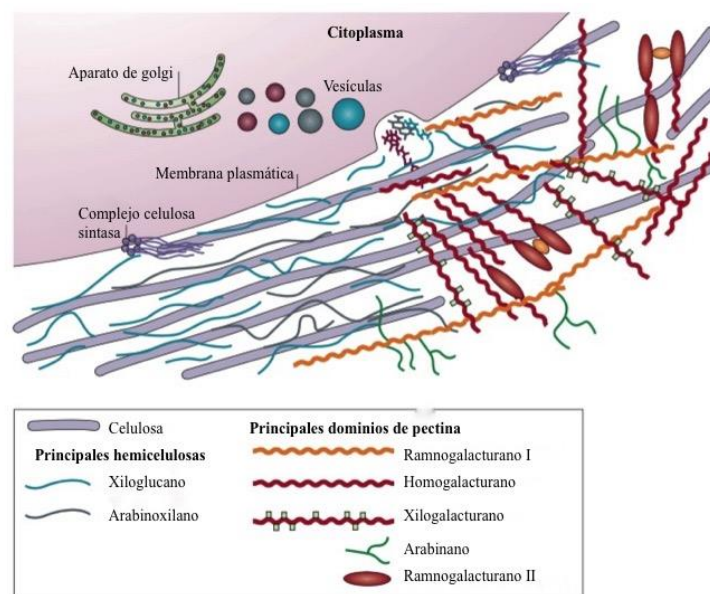
### 5.1 Componentes de la pared celular

La composición y estructura de la pared celular varía ligeramente entre las especies de plantas. La figura 4.2 muestra la composición básica presente en la mayoría de las especies vegetales, contiene microfibras de celulosa, hemicelulosa y pectina que junto con las proteínas forman una estructura rígida y compleja (Cosgrove, 2005).

La celulosa esta formada por enlaces  $\beta$ -1,4-D-glucosa de forma lineal, donde las moléculas de glucosa forman enlaces por puente de hidrogeno formando una microfibrilla cristalina mecánicamente fuerte y altamente resistente al ataque enzimático (Cosgrove. 2005). Por otra parte, la hemicelulosa es usualmente clasificada de acuerdo a los principales residuos de azúcar en la cadena principal del polímero, se presenta en forma de Xiloglucano que consiste en una columna vertebral de xilosa con residuos de glucosa, galactosa y fructosa. Arabinoxilano que consiste en un esqueleto de 1,4- $\beta$ -D-xilano con cadenas laterales de arabinosa y otras moléculas, como el ácido glucurónico y ésteres de ácido ferúlico. El xilano es el sustrato hemicelulolítico más abundante presente en la pared celular de maderas duras y cereales.

Este complejo heteropolisacárido contiene una columna vertebral de  $\beta$ -1,4-D-xilosa que puede ser ramificado por L-arabinosa, D-galactosa, además de residuos de acetilo, feruloil y ácido p-cumárico y glucurónico dependiendo la fuente de xilano. Mientras que los mananos se encuentran en cantidades menores. Los principales polisacáridos de pectina incluyen el ramnogalacturonano I y el homogalacturonano, con cantidades menores de xilogalacturonano, arabinano, arabinogalactano I y ramnogalacturonano II. Debido a su composición química y a la naturaleza de este sustrato, la degradación completa de la celulosa y xilano requiere de la acción de varios mecanismos para su completa descomposición.

**Figura 4.2** Estructura de la pared celular primaria



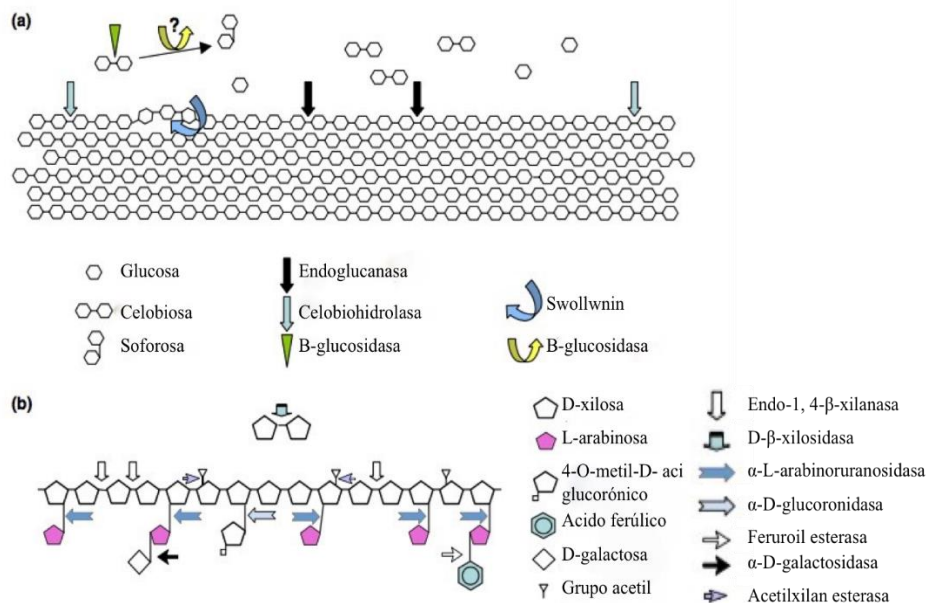
Fuente: Cosgrove, 2005

## 5.2 Enzimas implicadas en la degradación de la celulosa y hemicelulosa

La pared celular vegetal consiste principalmente en los grandes biopolímeros celulosa, y hemicelulosa. Estos biopolímeros son degradados con la ayuda de enzimas extracelulares que actúan sobre los enlaces glicosídicos terminales y/o internos. Estas son conocidas como enzimas de degradación de la pared celular (CWDE's). En la figura 4.3 (a) se muestra la acción de las enzimas celulasas donde actúan tres diferentes tipos; celobiohidrolasas (1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3. 2. 1. 91) que rompen unidades de celobiosa de los extremos del polisacárido, endoglucanasas (1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohidrolasas, EC 3. 2. 1. 4) encargadas de cortar las cadenas de celulosa internamente de las regiones amorfas proporcionando más extremos para que actúen las celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3. 2. 2. 21) que hidrolizan la celobiosa a glucosa.

Por otra parte, la figura 4.3 (b) muestra la hidrólisis del xilano por la acción sinérgica de enzimas, endo-xilanasas (endo- $\beta$ -1,4-xilanasas, EC 3.2.1.8) encargadas de romper internamente la cadena principal, exo-xilanasas ( $\beta$ -D-xilosidasas EC 3.2.1.37) liberan azúcares monoméricos y enzimas auxiliares que rompen cadenas laterales de polímeros u oligosacáridos que conducen a la liberación de monosacáridos o disacáridos. Además de enzimas encargadas de romper las ramificaciones de la cadena principal del xilano, entre los que participan enzimas en la degradación de arabinofuranosa ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, EC 3.2.1.55), ácido glucurónico ( $\beta$ -glucuronidasas, EC 3.2.1.139), ácido ferúlico (ácido ferúlico esterasa, EC 3.1.1.73) y grupos acetil (acetilxilan esterasa, EC 3.1.1.72).

**Figura 4.3** Degradación de celulosa y hemicelulosa. (a) sitios para las principales actividades de las enzimas celulolíticas y (b) sitios para las principales actividades de las enzimas hemicelulolíticas



Fuente: Aro et al., 2005

### 5.3 Regulación de los genes que codifican para enzimas celulosas y hemicelulasas

Los principales genes de celulosa y hemicelulosa son regulados de forma coordinada por la fuente de carbono disponible (Foreman et al., 2003; Aro et al., 2005), induciendo o reprimiendo la expresión de genes de celulosa y hemicelulosa. De tal manera que la producción de estas enzimas depende de un equilibrio entre los efectos de inducción y represión catabólica de los distintos compuestos presentes en el sustrato o medio de cultivo.

La regulación de los genes de la celulosa se ha analizado a nivel molecular principalmente en *T. reesei*, y se ha descrito la mayor variedad de compuestos que provocan la expresión de la celulosa para este hongo (Suto & Tomita, 2001; Aro et al., 2005; Amore et al., 2013; Gutiérrez-Rojas et al., 2015). La soforosa es el inductor soluble más potente y ha sido durante muchos años considerado como el inductor natural de las celulosas, pero es específica sólo para ciertos hongos incluyendo *Trichoderma reesei*, *Aspergillus terreus* y *Penicillium purpurgengen*, ya que se ha demostrado que la soforosa no induce expresión de celulosa en *Penicillium janthinellum*, *Penicillium chrysosporium*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger* (Gielkens et al., 1999; Nazir et al., 2010; Sun et al., 2012).



Igualmente, se ha demostrado que el crecimiento en presencia de celobiosa, xilobiosa, xilosa y sorbosa induce la expresión de la celulasa en *T. reesei* (Ilmén et al., 1997; Suto & Tomita, 2001). Por otra parte el disacárido lactosa es actualmente la única fuente de carbono soluble y económicamente factible que permite la expresión del gen de la celulasa y ha sido utilizada como fuente de carbono en la producción de enzimas homólogas y proteínas heterólogas bajo el promotor *cbh1* en *T. reesei* (Penttilä, 1998). Sin embargo aun no se entiende la expresión que provoca el efecto de la lactosa, ya que, no es un componente de los polímeros de la pared celular de la planta y en presencia de D-glucosa la transcripción se encuentra reprimida, mientras que en ausencia de ésta y en la presencia de celulosa la transcripción es fuertemente inducida (Suto & Tomita, 2001).

La producción de hemicelulasas por *T. reesei* se induce en presencia de celulosa, xilano, arabinano, soforosa, xilobiosa y L-arabitol. Se ha demostrado que la xilobiosa induce genes de *T. reesei* implicados en la hidrólisis de xilano, los genes de xilanasas (*xyn1* y *xyn2*) y  $\beta$ -xilosidasa (*bx11*), así como los genes de enzima  $\alpha$ -galactosidasa (*agl1* y *agl2*) y  $\alpha$ -glucuronidasa (*glr1*) (Margolles-Clark et al., 1997). Además, la expresión del otro gen xilanasas (*xyn2*) ha demostrado ser parcialmente constitutiva e inducible por xilobiosa y soforosa (Zeilinger et al., 1996). Sin embargo la xilosa a concentraciones muy bajas puede actuar como un inductor (Margolles-Clark et al., 1997) y a concentraciones más altas como represora, como se ha demostrado en *A. niger* (De Vries et al., 1999). Mientras que la arabinosa y L-arabitol inducen la expresión de un conjunto de genes que codifican enzimas implicadas en la degradación del arabinoxilano, por ejemplo, los genes que codifican arabinofuranidasas (*afbA* y *afbB*) y arabinoxilano arabinofuranohidrolasa (*axhA*) en *A. niger* (de Vries et al., 1994; Gielkens et al., 1997). Por otra parte, L-arabitol induce la expresión de *xyn1*, *xyn2*, *bx11*, *agl1*, *agl2*, y el gen *abf1* que codifica la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (Margolles-Clark et al., 1997).

#### 5.4 Factores de transcripción que regulan la expresión génica de celulasa y hemicelulasa

La producción de enzimas celulasas y hemicelulasas es regulada principalmente a nivel transcripcional (Raulo et al., 2016) por factores de transcripción (FT), proteínas de unión a secuencias de DNA reguladoras que se unen a los promotores de genes que codifican las enzimas implicadas en la degradación de los biopolímeros (Aro et al., 2005; Kowalczyk et al., 2015).

Durante los últimos años, los genes que codifican las enzimas degradantes de la pared celular de la planta han demostrado estar sujetos a regulación por diversos factores y algunos han sido caracterizados. Varios estudios genómicos y transcriptómicos se han realizado en *T. reesei* para revelar la proteómica funcional de las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas. Productos génicos que codifican las enzimas lignocelulolíticas de *T. reesei* están coordinadamente regulados por un conjunto de FT, tales como *XYR1*, *ACE1*, *ACE2*, *CRE1* y *HAP 2/3/5* (Bischof et al., 2015), que son necesarios para la regulación positiva y negativa de la producción enzimática (Aro et al., 2005; Stricker et al., 2007; Dashtban et al., 2011).

El principal regulador positivo de la expresión genética de celulasas y hemicelulasas para la degradación de xilano es *Xyr1* (Stricker et al., 2006; Stricker et al., 2008; Van Peij y et al., 1998, Stricker y et al., 2006, Mach-Aigner y et al., 2012), es una proteína de unión al DNA con un cluster binuclear de zinc. Esta proteína se une al motivo 5'GGCTA3' ubicado como una repetición invertida separada por 10 pb en la región promotora (Rauscher et al., 2006; Stricker et al., 2006). Se demostró que la regulación transcripcional de los principales genes hidrolíticos que codifican para los genes *xyn1* y *xyn2* (xilanasas I y II), *cbh1* y *cbh2* (celobiohidrolasas I y II) y *egl1* (endoglucanasa I) es estrictamente dependiente de *Xyr1* (Stricker et al., 2008). La regulación de los genes a través de *Xyr1* no es afectada por D-xilosa, xilobiosa, soforosa y lactosa (Stricker et al., 2007, Stricker et al., 2006). La expresión de *Xyr1* está regulada exclusivamente por represión catabólica por carbono bajo el regulador negativo *Cre1*-dependiente (Mach-Aigner et al., 2008; Stricker et al., 2007).

El regulador transcripcional XlnR (gen ortólogo del FT Xyr1 de *T. reesei*) de *Aspergillus niger*, ha demostrado estar regulado por los genes XlnB, XlnC y XlnD que codifican endoxilanasas B, endoxilanasas C y  $\beta$ -xiliosidasa, respectivamente. También está implicado en la activación de los genes de transcripción de celulasa, tales como las que codifican para las dos endoglucanasas eglA y eglB (Van Peij et al., 1998; Gielkens et al., 1999). Además, el XlnR ha demostrado que afecta positivamente la transcripción de varios genes implicados en la degradación de hemicelulosa, incluyendo glucuronidasa A, acetilxilanesterasa A, arabinofuranohidrolasa A y feruloilesterasa A (Amore et al., 2013).

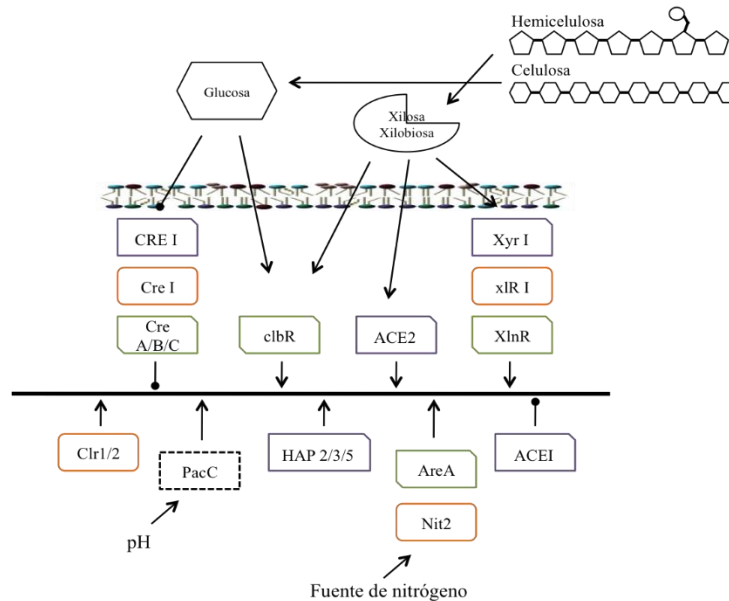
Los FT como ACE1, ACE2 y ACE3 son responsables de la regulación de la celulasa y la hemicelulasa que codifican los genes en *T. reesei* (Aro et al., 2003; Häkkinen et al., 2014), al igual que Xyr1, los FT ACE2 y ACE3 son una proteína con un cluster binuclear de zinc. El gen ACEII (*ace2*) es un regulador de transcripción positivo de genes que codifican para xilanasas y varias enzimas celulolíticas. Se ha demostrado que se unen in vitro a 5'GGCTAATAA del promotor del gen *cbh1* y *xyn2* de *T. reesei* y regula los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* y *xyn2* (Aro et al., 2001), y la reducción de la actividad total de la celulasa por 30-70%. El gen *Ace1* de *T. reesei* codifica para un FT de tipo Cys2-His2 y se demostró que se unen in vitro a ocho sitios que contienen la secuencia 5' AGGCA dispersos a lo largo del promotor *cbh1*. La delección de *Ace1* dio lugar a un aumento en la expresión de los genes de celulasa y dos genes de xilanasas en cultivos inducidos por soforosa y celulosa, indicando que ACEI actúa como represor de la expresión de celulasa y xilanasas (Aro et al., 2003). También se ha demostrado que ACEI compite con XyrI por el sitio de unión (Rauscher et al., 2006) y reprime la expresión génica de Xyr1 (Mach-Aigner et al., 2008). Se obtuvo más evidencia sobre la función antagónica de ACEI hacia XYRI combinando la expresión constitutiva de Xyr1 bajo un promotor fuerte y la regulación negativa de *Ace1*, lo que condujo a una producción mejorada de actividad de celulasa y xilanasas por *T. reesei* Rut-C30 cultivado en celulosa (Wang et al., 2013).

La clave en la represión de la glucosa en *Trichoderma spp.*, se debe al FT Cre1 de tipo Cys2His2 (Ilmén et al., 1996; Dowzer & Kelly, 1991), la dinámica de represión catabólica de Cre1 ha sido mejor comprendida gracias al estudio del mutante RUT-C30, el cual Cre1 aparece truncado y solo codifica para una de las 2 regiones de "dedos de zinc" de la proteína Cre1. De esta manera, *T. reesei* RUT-C30 produce celulasas y hemicelulasas en un medio que contiene glucosa, y cuando se complementa la mutación con el gen Cre1 de la cepa silvestre se restaura el fenotipo de represión por glucosa (Ilmén et al., 1996). Además, se ha determinado que el papel de Cre1 va más allá de no permitir la represión por glucosa al demostrar que la delección de Cre1 en una cepa silvestre lleva al incremento tanto en la actividad como en la cantidad de RNAm de celulasas en un medio con glucosa, resultado esperado por la liberación de la represión catabólica (Nakari-Setälä et al., 2009). También se observó que la producción de celulasas en el medio con glucosa fue mucho más baja que en un medio con celulosa para la cepa deficiente en Cre1, así como un aumento en la producción de proteínas en el medio con celulosa, evidenciando que Cre1 juega un papel importante en la modulación de la expresión de genes de celulasas bajo condiciones de inducción.

Por otra parte, se ha reportado que los genes CreA, CreB y CreC (genes ortólogos de *T. reesei*) de *Aspergillus spp.* están involucrados en el mecanismo de regulación de la represión de catabólica de carbono (Dowzer & Kelly, 1991; Todd et al., 2000; Lockington & Kelly, 2001). La represión por CreA en *Aspergillus* ha demostrado que codifican celulasas, arabinasas, endoxilanasas y otras actividades xilanolíticas como xilosidasa, feruloil esterasa y algunas pectinasas (De Vries & Visser, 2001). En *A. niger*, la expresión de genes xilanolíticos y celulolíticos es fuertemente reprimida por glucosa, fructosa y D-xilosa. Esta represión es mediada fundamentalmente por CreA, que es el ortólogo de Cre1 en *T. reesei* (De Vries et al., 1999; Ruijter & Visser, 1997). De Vries et al., (1999) evaluaron esta dinámica comparando la expresión de genes xilanolíticos en una cepa silvestre y una mutante para CreA encontrando que el nivel de expresión de estos genes depende del balance entre la inducción por XlnR y la represión por CreA.

La D-xilosa es liberada gradualmente del xilano, lo que lleva a una baja concentración de D-xilosa en el medio. Bajo estas condiciones la represión por D-xilosa mediada por CreA es baja y se detectan niveles altos de expresión. Cuando los niveles de D-xilosa en el medio alcanzan concentraciones de 70 mM, la represión a través de CreA juega un papel más importante, resultando una disminución de los niveles de expresión (De Vries et al., 1999). En la Figura 4.4 se muestran los FT positivos y negativos que se conocen hasta el momento, en los 3 modelos estudiados, *T. reesei*, *A. niger* y *N. crassa*, responsables de dicha regulación.

**Figura 4.4** Representación esquemática de los factores que afectan a la transcripción celulasas y xilanasas expresión en *T. reesei* (recuadro morado), *Neurospora crassa* (caja naranja) y *Aspergillus* spp. (verde)



Fuente: Amore et al., 2013

Estudios recientes, han evaluado los niveles relativos de expresión de los genes que codifican las actividades hidrolasa y los genes que codifican elementos de regulación, tales como el AreA, PacC y CreA, mediante técnicas de PCR en tiempo real (RT-qPCR) empleadas para identificar posibles mecanismos de regulación transcripcional en *Aspergillus oryzae* durante fermentación en estado sólido (McKelvey & Murphy, 2010).

Mientras que, Sun y Glass (2011) evaluaron el nivel de expresión de genes y la actividad de celulasas en una mutante para el ortólogo de Cre1/CreA en *N. crassa*. Cuando este mutante se sembró en un medio con Avicel® como única fuente de carbono, mostró una mayor velocidad en el consumo del sustrato en comparación con la cepa silvestre, alcanzando el 30% más de proteínas secretadas al medio y el aumento del 50% en la actividad de endoglucasas, demostrando el rol de Cre1 en la represión de la expresión de celulasas. Coradetti et al., (2012) reportaron dos nuevos factores de transcripción, para el crecimiento y la actividad enzimática sobre celulosa, pero no requeridos sobre hemicelulosa o xilano y, que codifican para factores de transcripción de la superfamilia del cluster binuclear de zinc específicos de hongos. Demostrando que Clr-1 es un elemento crítico en el mecanismo para la detección de celobiosas de *N. crassa*, durante su crecimiento en Avicel® promoviendo la expresión de genes necesarios para la utilización de celobiosas. Los estudios realizados en *T. reesei*, *A. niger* y, recientemente en *N. crassa* relacionados con los mecanismos de hidrólisis enzimática y los relacionados con la expresión de los genes que codifican a esas mismas, muestran similitudes y diferencias en los mecanismos de acción entre ellos.

Una de las mayores similitudes entre *T. reesei* y *A. niger* es la presencia de un FT Xyr1/XlnR responsable de la activación de la transcripción bajo condiciones de inducción. Además, en *T. reesei* se han identificado el regulador positivo Ace2, cuyo ortólogo no han sido reportados en *Aspergillus* spp. Otra característica en común en estos sistemas es el fenómeno de represión catabólica, en donde el producto final de la hidrólisis enzimática es el directo responsable de la regulación negativa a nivel transcripcional. Este mecanismo evita que el hongo sintetice una cantidad excesiva de celulasas cuando existe disponibilidad de otras fuentes de carbono fácilmente asimilables.

La regulación de los genes que codifican las enzimas necesarias para la degradación y asimilación de sustratos de gran complejidad por FT activa o reprime la transcripción de promotores específicos implicados en la síntesis y secreción de grandes cantidades de enzimas lignocelulolíticas a partir de la degradación de sustratos complejos presentes en el medio que se desarrollan.

Para el control de la expresión genética, el análisis de los mecanismos de acción enzimática y regulación es un área importante de la investigación. Donde las proteínas activadoras de la transcripción son las más estudiadas, que debido a la unión a secuencias de DNA reguladoras permiten incrementar la expresión de genes que codifican para la síntesis de enzimas hidrolíticas.

Diferentes estudios involucrados en la regulación transcripcional se han visto reflejados dentro del género *Trichoderma*. Hasta la fecha, algunos activadores de la transcripción han sido descritos de forma detallada (Rauscher *et al.*, 2006; Stricker *et al.*, 2006; Mach-Aigner *et al.*, 2008), por ello, el estudio de nuevos FT involucrados en la activación de enzimas xilanasas y celulasas de interés biotecnológico en otras especies permitirán el incremento en su producción. Muchas de las enzimas degradadoras de biopolímeros han recibido atención considerable por su aplicación potencial. El uso de enzimas degradadoras de lignocelulosa a partir de la hidrólisis de biomasa vegetal es objeto de estudio, ya que los azúcares liberados podrían servir de materia prima en la bioproducción de productos químicos y biocombustibles por microorganismos.

## **6 Importancia biotecnológica de *Trichoderma***

Los hongos del género *Trichoderma* spp. han sido explotados en aplicaciones biotecnológicas, el uso de algunas de estas especies resultan de interés para la producción de proteínas biológicamente importantes y son más conocidos por su capacidad para producir enzimas que degradan la celulasas y hemicelulasas utilizadas para despolimerizar la biomasa a azúcares simples que se convierten en productos intermedios químicos y biocombustibles, como el etanol. Por ello, que en los últimos años la búsqueda de nuevos genes encargados de la regulación enzimática a partir de microorganismos del género *Trichoderma* ha proporcionando información muy valiosa, evaluando las vías de regulación como respuesta a los diversos polímeros vegetales.

Los beneficios de *Trichoderma* spp. en la agricultura se debe a su capacidad para proteger los cultivos contra las enfermedades y aumentar el rendimiento de los cultivos en condiciones de campo (Lorito *et al.*, 2010) siendo los microorganismos más empleados, con más del 60% de los biofungicidas registrados en todo el mundo (Verma *et al.*, 2007). Son colonizadores de las raíces de muchas plantas como simbioses vegetales oportunistas y avirulentos (Harman *et al.*, 2004) y utilizados como agentes de biocontrol, por su acción biológica contra sus competidores (Brotman *et al.*, 2010; Lorito *et al.*, 2010). Se ha reportado que promueve el crecimiento vegetal, facilita la absorción de agua, sales minerales, nutrientes y el uso de carbohidratos. Los mecanismos de defensa, la producción y secreción de enzimas, el desarrollo sexual y la respuesta a condiciones ambientales como nutrientes y luz han sido estudiados con gran detalle con muchas especies de este género.

Diversos estudios están enfocados en desarrollar cepas encargadas de producir metabolitos secundarios tales como antibióticos, micotoxinas, fitotoxinas (Mukherjee *et al.*, 2006, Shores & Harman, 2008b, 2008) y enzimas que degradan la pared celular (Sharma *et al.*, 2011; Hermosa *et al.*, 2012). *Trichoderma* es el género más estudiado, con el genoma de tres especies disponibles; *Trichoderma reesei*, *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens* (Schuster & Schmoll, 2010). En los últimos años, el incremento de estudios han contribuido a dilucidar la base molecular de la interacción *Trichoderma*-planta y los efectos beneficiosos para las plantas (Hermosa *et al.*, 2012), para diseñar cepas que sean más efectivas que las silvestres y con el objetivo de conocer los mecanismos moleculares de las interacciones de estos organismos con factores bióticos y abióticos.

## 7 Referencias

- Alfano G., Ivey ML., Cakir C., Bos JL., Miller SA., Madden LV., Kamoun S., Hoitink HA. (2007). Systemic Modulation of Gene Expression in Tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology*. 97:429-37. doi: 10.1094/PHYTO-97-4-0429.
- Amore A., Giacobbe S., Faraco V. (2013). Regulation of Cellulase and Hemicellulase Gene Expression in Fungi. *Current Genomics*. 14, 230-249.
- Argumedo-Delira R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Peña-Cabriales JJ. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos, *Revista internacional de contaminación ambiental*. 25, 257-269.
- Aro N., Ilmén M., Saloheimo A., Penttilä M. (2003). ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Applied and Environmental Microbiology* 69:56–65
- Aro N., Pakula T., Penttilä M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 719–739
- Aro N., Saloheimo A., Ilmén M., Penttilä M. (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 24309-24314.
- Bailey BA., Bae H., Strem MD., Roberts DP., Thomas SE., Crozier J., Samuels GJ., Chooi IY., Holmes KA. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*. 224:1449-64.
- Benhamou N., Chet I. (1997). Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 2095–2099.
- Bischof RH., Horejs J., Metz B., Gamauf C., Kubicek C.P., Seiboth B. (2015). L-Methionine repressible promoters for tuneable gene expression in *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*. 14, 14-120. doi: 10.1186/s12934-015-0308-3.
- Bissett J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*. 69, 2373-2417.
- Blaszczyk L., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., Jedryczka M. (2014). *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of plant protection research*. 54, 309-317.

- Brotman Y., Briff E., Viterbo A., Chet I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147, 779-789
- Brotman Y., Kapuganti JG., Viterbo A. (2010). *Trichoderma*. *Current Biology*. 20, R390-1. doi: 10.1016/j.cub.2010.02.042.
- Chacón MR., Rodríguez-Galán O., Benítez T., Sousa S., Rey M., Llobell A., Delgado-Jarana J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology*. 10, 19-27.
- Coninck BD., Timmermans P., Vos C., Cammue BPA., Kazan K. (2015). What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Sciences* 20, 91-101. doi: org/10.1016/j.tplants.2014.09.007.
- Contreras-Cornejo HA., Macías-Rodríguez L., Beltrán-Peña E., Herrera-Estrella A., López-Bucio J. (2011). *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signal Behav.* 6, 1554-63. doi: 10.4161/psb.6.10.17443.
- Contreras-Cornejo HA., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., López-Bucio J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149, 1579–1592. doi: 10.1104/pp.108.130369
- Coradetti ST., Craig JP., Xiong Y., Shock T., Tian C., Glass NL. (2012). Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 7397-402. doi:10.1073/pnas.1200785109.
- Crosgrave DJ., (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6, 850-61.
- Dashtban M., Buchkowski R., Qin W. (2011). Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2, 274-286.
- De Jonge R, Van Esse HP, Kombrink A, Shinya T., Desaki Y., Bours R., Van der Krol S., Shibuya N., Joosten M., Thomma B. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*. 329, 953-955
- De Vries RP., Visser J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65, 497-522.
- De Vries RP., Visser J., de Graaff LH. (1999). CreA modulates the XlnR induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Research in Microbiology*. 150, 281-285.
- De Vries MC., Tankersley RA., Forward RB., Kirby-Smith WW., Luettich RA. (1994) Abundance of estuarine crab larvae is associated with tidal hydrologic variables. *Marine Biology* 118, 403-413.

Degenkolb T., Berg A., Gams W., Shlegel B., Gráfe U. (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *Journal of Peptide Science* 9, 666-78.

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

Dowzer CE., Kelly JM. (1991). Analysis of the CreA gene; a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology.* 11, 5701-5709.

Eberharther A., Becker PB. (2004). ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *Journal of Cell Science.* 117, 3707-3711.

Engelberth J., Koch T., Schüler G., Bachmann N., Rechtenbach J., Boland W. (2001). Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrils coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiology.* 125, 369-377.

Foreman PK., Brown D., Dankmeyer L., Dean R., Diener S., Dunn-Coleman NS., Goedegebuur F., Houfek TD., England GJ., Kelley AS, Meerman HJ., Mitchell T., Mitchinson C., Olivares HA., Teunissen PJ., Yao J, Ward M. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *T. reesei*. *Journal of Biological Chemistry.* 278, 31988-31997.

Gams W., Bisset J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3–34. In: "Trichoderma and Gliocladium" (G.E. Harman, C.P. Kubicek, eds.). Taylor & Francis, London, UK, pp. 393.

Garnica-Vergara A., Barrera-Ortiz S., Muñoz-Parra E., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Macias-Rodríguez L., Ruiz-Herrera LF., Lopez-Bucio J. (2015). The volatile 6-pentyl- 2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *New Phytologist.* 209, 1496-1512. doi: 10.1111/nph.13725

Gielkens M., Dekkers E., Visser J., de Graaff LH. (1999). Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Applied and Environmental Microbiology.* 65, 4340-5.

Gielkens MM., Visser J. de Graaff LH. (1997). Arabinoxylan degradation by fungi: characterization of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. *Current Genetics.* 31, 22-29

Grossmann K. (2010). Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science.* 66, 113-120. doi: 10.1002/ps.1860

Gutiérrez-Rojas I., Moreno-Sarmiento N., Montoya D. (2015). Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: classical cases and new models. *Revista Iberoamericana de Micología.* 32, 1-12. doi: 10.1016/j.riam.2013.10.009

Hakkinen M., Valkonen MJ., Westerholm-Parvinen A., Aro N., Arvas M., Vitikainen M., Penttilä M., Saloheima M., Pakula T. (2014). Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. *Biotechnol Biofuels.* 7, 14. doi: 10.1186/1754- 6834-7-14

- Hammerschmidt R., Metraux, JP. Van Loon LC. (2000). Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. *European Journal of Plant Pathology*. 107, 1-6.
- Hanson LE., Howell CR. (2004). Elicitors of plant defense responses from biological control strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. 94, 171-6. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.2.171.
- Harman GE., Howell CR., Viterbo A., Chet I. Lorito M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2, 43-56.
- Harman GE. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96, 190-4. doi: 10.1094/PHYTO-96-0190.
- Hermosa R., Rubio MB., Cardoza RE., Nicolás C., Monte E., Gutiérrez S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*. 16, 69-80.
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158, 17-25
- Howell CR. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87, 4-10.
- Howell CR. (1998). The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman GE, Kubicek CP. *Trichoderma y Gliocladium*, vol. 2. Taylor & Francis, Padstow, pp 173-184
- Ilmén M., Saloheimo A., Onnela ML., Penttilä ME. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 1298-1306
- Ilmén M., Thrane C., Penttilä M. (1996). The glucose repressor gene cre1 of *T. virens*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Molecular Genetics and Genomics*. 251, 451-460.
- Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24. 14-21.
- Keswani C., Mishra S., Sarma B., Singh S., Singh H. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 533-544.
- Kowalczyk JE., Gruben BS., Battaglia E., Wiwbwnga A., Maljoor E., de Vries RP. (2015). Genetic Interaction of *Aspergillus nidulans* galR, xlnR and araR in Regulating D-Galactose and L-Arabinose Release and Catabolism Gene Expression. *PLoS One*. 18,10:e0143200. doi: 10.1371/journal.pone.0143200.
- Kubicek C., Herrera-Estrella A. Seidl-Seiboth V. Martinez D., Druzhinina I., Thon M., Zeilinger S., Casas-Flores S., Horwitz B., Mukherjee P., Mukherjee M., Kredics L., Alcaraz L., Aerts A., Antal Z., Atanasova L., Cervantes M., Challacombe J., Chertkov O., Grigoriev I. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*. 12. R40. 10.1186/gb-2011-12-4-r40.



- Lee S., Yap M., Behringer G., Hung R., Bennett JW. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*. 3, 7. doi: 10.1186/s40694-016-0025-7
- Lockington RA., Kelly JM. (2001). Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. *Molecular Microbiology*. 40, 1311-1321.
- Lorenzo DG., Brutus A, Savatin DV., Sicilia F., Cervone F. (2011). Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS Letters*. 585, 1521-1528.
- Lorito M., Woo SL, Harman GE., Monte E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*. 48, 395-417. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314
- Lorito M., Woo SL., Harman GE., Monte E. (2010). Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. *Annual Review of Phytopathology*. 48: 395-417.
- Luo Y., Zhang DD., Dong XW., Zhao PB., Chen LL., Song XY., Wang XJ., Chen XL., Shi M., Zhang YZ. (2010). Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. *FEMS Microbiology Letters*. 313, 120-126.
- Mach-Aigner A. R., Pucher M. E., Steiger M.G., Bauer G.E., Preis S.J., Mach R.L. (2008). Transcriptional regulation of *xyl1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 6554-6562.
- Mach-Aigner AR, Omony J, Jovanovic B, van Boxtel AJB, de Graaff LH. D-xylose concentration-dependent hydrolase expression profiles and the function of CreA and XlnR in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78, 3145-55. doi:10.1128/aem.07772-11.
- Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., Steiger, M. G., Bauer, G. E., Preis, S. J., and Mach, R. L. (2008). Transcriptional regulation of *xyl1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 6554-6562. doi: 10.1128/AEM.01143-08
- Margolles-Clark E., Ilmen M., Penttilä M. (1997). Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology* 57, 167-179.
- Martínez B., Infante D., Reyes Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*. 28, 1-11.
- Martínez C., Blanc F., Le Claire E., Bernard O., Nicole M. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology*. 127, 334-44.
- McBeath J, Adelman M. (1991). Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. *Phytopathology*. 81, 1151.
- McKelvey SM., Murphy RA. (2010). Analysis of wide-domain transcriptional regulation in solid-state cultures of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37, 455-69. doi: 10.1007/s10295-010-0691-z.

- Monte E. (2001). Understanding *Trichoderma*, between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*. 4, 1–4.
- Morán-Diez E., Rubio B., Domínguez S., Hermosa R., Monte E., Nicolás C. (2012). Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Physiology*. 169, 614-20. doi: 10.1016/j.jplph.2011.12.016.
- Mukherjee M., Horwitz BA., Sherkhane PD., Hadar R., Mukherjee PK. (2006). A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens* evidence from analysis of genes underexpressed in a mutant of defective in morphogenesis and antibiotic production. *Current Genetics*. 50, 193-202.
- Nakari-Setälä T., Paloheimo M., Kallio J., Vehmaanperä J., Penttilä M., Saloheimo M. (2009). Genetic modification of carbon catabolite repression in *T. virens reesei* for improved protein production. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 4853-4860.
- Nazir A., Soni R., Saini HS., Kaur A., Chadha BS. (2010). Profiling differential expression of cellulases and metabolite footprints in *Aspergillus terreus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162, 538-47. doi: 10.1007/s12010-009-8775-9.
- Paul D., Park KS. (2013). Identification of volatiles produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a fungal biocontrol agent that promotes plant growth. *Sensors (Basel)*. 13, 13969-13977. doi: 10.3390/s131013969
- Penttilä M. (1998). Heterologous protein production in *Trichoderma*. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London, pp 365-382
- Pieterse CMJ., Leon-Reyes A., Vander S., Van Wees SCM. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5, 308-316.
- Purschwitz J., Müller S., Kastner C., Fischer R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 9, 566-71
- Raulo R., Kokolski M., Archer DB. (2016). The roles of the zinc finger transcription factors XlnR, ClrA and ClrB in the breakdown of lignocellulose by *Aspergillus niger*. *AMB Express*. 6, 5. doi: 10.1186/s13568-016-0177-0.
- Rauscher R., Wurleitner E., Wacenovsky E., Aro N., Stricker AR., Zeilinger S., Kubicek CP., Penttilä M., Mach RL. (2006). Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding Xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*. 5, 447-56.
- Rauscher R., Wurleitner E., Wacenovsky E., Aro N., Stricker A.R., Zeilinger S *et al.* (2006). Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding Xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell*. 5, 447-56.
- Reino JL., Guerrero RF., Hernandez-Galan R., Collado IG. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*. 7, 89–123.
- Ruijter GJ, Visser J. (1997). Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiology*. 151, 103-14.

- Salas-Marina MA., Silva-Flores MA., Cervantes-Badillo MG., Rosales-Saavedra MT., Islas-Osuna MA., Casas-Flores S. (2011). The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21, 686-96.
- Salmond GPC. (1994). Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 32, 181-200.
- Sharma R., Tan F., Jung KH., Sharma MK., Peng Z., Ronald PC. (2011). Transcriptional dynamics during cell wall removal and regeneration reveals key genes involved in cell wall development in rice. *Plant Molecular Biology*. 77, 391-406. doi: 10.1007/s11103-011-9819-4.
- Shoresh M., Harman GE. (2008b). The relationships between increased growth and resistance induced in plants by root colonizing microbes. *Plant Signal & Behavior* 3, 737-739.
- Shoresh M., Harman GE. (2008a). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: A proteomic approach. *Plant Physiol*. 147, 2147-2163.
- Shoresh M., Harman GE., Mastouri F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48, 21-43.
- Stergiopoulos I., De Wit PJGM. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*. 47, 233-263.
- Stricker A. R., Grosstessner-Hain K., Wurleitner E., Mach R. L. (2006). Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*. 5, 2128-2137.
- Stricker AR., Grosstessner-Hain K., Wurleitner E., Mach RL. (2006). Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*. 5, 2128-2137
- Stricker, A. R., Steiger, M. G., and Mach, R. L. (2007). Xyr1 receives the lactose induction signal and regulates lactose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *FEBS Letter*. 581, 3915-3920. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.025.
- Stricker AR., Mach RL., De Graff LH. (2008). Regulation of transcription of cellulases and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*T. virens reesei*). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78, 211-220.
- Sun J., Glass NL. (2011). Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE* e25654.
- Sun J., Tian C., Diamond S., Glass NL. (2012). Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa* *Eukaryotic Cell*. doi:10.1128/EC.05327-11.
- Suto M., Tomita F. (2001). Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Bioscience and Bioengineering*. 92, 305-11.

- Todd RB., Lockington RA., Kelly JM. (2000). The *Aspergillus nidulans* creC gene involved in carbon catabolite repression encodes a WD40 repeat protein. *Molecular Genetics and Genomics*. 263, 561-570.
- Van Peij, N.N., Visser, J. and de Graaff, L.H. (1998). Isolation and analysis of xlnR, encoding a transcriptional activator coordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*. 27, 131-142.
- Verma M., Brar SK., Tyagi RD., Surampalli RY., Valéro JR. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panopoly of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 37, 1-20.
- Viterbo A., Landau U., Kim S., Chernin L., Chet I. (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiology Letters*. 305, 42–48.
- Viterbo A., Horwitz B.A. (2010). Mycoparasitism. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, vol. 42, pp. 676–693. Edited by K. A. Borkovich & D. J. Ebbole. Washington: American Society for Microbiology.
- Wang S, Liu G, Wang J, Yu J, Huang B, Xing M. (2013). Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 40, 633-41. doi: 10.1007/s10295-013-1253-y.
- Wells H., Bell D., Jaworski C. (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 62, 442-447.
- Zhang C., Druzhinina I., Kubick CP., Xu T. (2005). *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letter*. 251, 251-257.
- Zeilinger S., Mach RL., Schindler M., Herzog P., Kubicek CP. (1996). Different inducibility of expression of the two xylanase genes xyn1 and xyn2 in *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 25624-9.
- Zipfel C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*. 35, 345-351, doi: 10.1016/j.it.2014.05.004.