



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
UNIDAD IRAPUATO

LABORATORIO NACIONAL DE GENÓMICA PARA LA  
BIODIVERSIDAD

“ Estudio del probable factor de transcripción Blu7, con dedos de zinc tipo C2H2, en la conidiación de *Trichoderma atroviride* por estímulo de la luz”

**PRESENTA**

M. C. José Ermenegildo Cetz Chel

**ASESOR**

Dr. Alfredo H. Herrera Estrella

**COMITÉ TUTORIAL**

Dr. José Ruiz Herrera

Dr. John P. Délano Frier

Dr. Alexander de Luna Fors

Dr. Stefan de Folter

Dr. J. Sergio Casas Flores

**Este proyecto de Tesis de Doctorado en Ciencias en Biotecnología de Plantas fue realizado en el Laboratorio de Expresión Génica de Hongos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, del CINVESTAV-IPN unidad Irapuato, bajo la asesoría de Dr. Alfredo H. Herrera Estrella.**

---

## **Dedicatorias**

A mis padres por ser parte integral de mi formación, inspiración y empuje hacia el lado positivo de la vida.

Wilfrido y Ma. Dominga

A mis hermanos Anton, Wil y Juanjo quienes han influenciado de forma positiva en mis decisiones, en especial a Anton por su gran ayuda en los momentos críticos y sobre todo por permitir siempre una sana discusión.

A mi hermana Luci, a quien quiero mucho y que siempre tiene una gran sonrisa que ofrecerme.

A mis sobrinos Ángel, Abraham, Mariana, Nadia, Andy y Luz por forjar en gran medida mi alegría.

## **Agradecimientos**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haberme otorgado la beca con número de registro **203267**, sin la cual no hubiera sido posible la participación en el postgrado y la elaboración del proyecto de tesis en el CINVESTAV, unidad Irapuato.

Al Dr. Alfredo H. Herrera Estrella, por integrarme a su grupo de trabajo del laboratorio y compartir sus conocimientos en mi formación académica así como permitirme una gran libertad en la elaboración de este proyecto e integrarme en la comunidad de *Trichoderma*.

A mis sinodales, el Dr. José Ruiz Herrera, Dr. Alexander de Luna Fors, Dr. John Délano Frier, Dr. Stefan de Folter por su participación y comentarios acertados en la discusión y dirección del proyecto.

Al sinodal externo, Dr. J. Sergio Casas Flores por sus contribuciones en la revisión y sugerencias para mejorar el documento de tesis.

Al Dr. Luis Brieba por su participación como asesor asignado por el departamento al inicio del proyecto y durante las sesiones tutorales siguientes.

Al Biol. Fernando Hernández por su apoyo técnico, sus comentarios y su amistad.

Al Dr. E. Ulises Esquivel Naranjo por su contribución en la obtención de las mutantes en este trabajo, así como su apoyo en la discusión de los datos.

Al Dr. Edgar Balcazar López por su participación en la obtención de la sobreexpresante de *blu7*. Por sus comentarios oportunos y su Amistad.

Al IBQ Pedro Martínez por facilitar el material necesario para la realización del proyecto.

Un gran reconocimiento al Trichos-Lab: Liz, Martitia, Moni, Nohemi, Emmy, Mike, Bricio, El Alex, Manu por los comentarios durante las sesiones de grupo que siempre fueron inspiradoras.

Al M. en C. Fabricio López y M. en C. Manuel Villalobos por compartir sus conocimientos en estadística y bioinformática que fueron de gran ayuda.

A Araceli Fernández por su gran apoyo en la manipulación de datos bioinformáticos y su Amistad.

A los compañeros que fomentaron el deporte tanto como la ciencia en este instituto motivando la competitividad sana en lo académico y lo social.

## Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
<i>al-1, al-3</i>	<i>albino-1, albino-3</i>
AMPc	Ciclyc Adenine MonoPhosphate
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Mensajero de ácido ribonucleico
ATP	Adenosine Triphosphate
<i>bld</i>	<i>blue light down-regulated gene</i>
BLR1, BLR2	Blue Light Regulator 1, Blue Light Regulator 2
BLRC	Blue Light Regulator Complex
Blu7	Blue light up regulated protein-7
<i>blu7</i>	<i>blue light up-regulated gene-7</i>
C2H2	Cisteína(2)Histidina(2)
cADN	ADN complementario
car	Carotene (mutant)
<i>con6, con10</i>	<i>conidiation 6, conidiation 10</i>
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
Cry	Cryptochrome
CS	Cepa silvestre
<i>csp1</i>	<i>conidial separation-1</i>
dCTP	Desoxi-cytosine transferase
<i>env1, ENV1</i>	<i>envoy, ENVOY</i>
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FsT	Factores de transcripción
FT	Factor de transcripción
GO	Gene Ontology
GPCR	G protein coupled receptor

h	horas
Hph	Higromycine phosphotransferase
Kb	Kilobase
MAD -A,-B	Max Delbrück –A, B
ml	mililitro
MM	Medio mínimo
<i>nop-1</i>	<i>new eukaryotic opsin 1</i>
°C	Grados Celsius
PAS	Period-Aryl hydrocarbon nuclear translocator-Single-minded
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction
<i>pd</i>	<i>phosphodiesterase (fosfodiesterasa)</i>
PDA	Potato Dextrose Agar
Phy	Phytochrome
RNA-seq	Ribonucleic Acid -sequencing
<i>sah1</i>	<i>short aerial hyphae-1</i>
SUB-1	Submerged Protoperithecia-1
UTR	Untranslated region
UV	Ultra-Violeta
<i>vad-3</i>	<i>vegetative (growth) asexual development-3</i>
<i>vvd, VVD</i>	<i>vivid, VIVID</i>
WC-1, WC-2	White Collar-1, White Collar-2
WCC	White Collar Complex
WT	Wild-Type
Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>	Zinc(II)2-Cisteína(6)

# Índice

<b>Dedicatorias</b> .....	<b>II</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>III</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>V</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1.0.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1.0 Percepción de la luz en hongos: organismos con visión .....	5
1.1.1 Fotorreceptores de luz roja.....	7
1.1.2 Fotorreceptores de luz verde .....	8
1.1.3 Fotorreceptores de luz azul .....	9
1.2.0 Regulación de las respuestas a luz en hongos filamentosos .....	12
1.2.1 Regulación del fototropismo.....	13
1.2.2 Regulación del metabolismo .....	15
1.2.3 Regulación de la reproducción sexual y asexual .....	18
<b>2.0.0 ANTECEDENTES</b> .....	<b>19</b>
2.1.0 Efectos de la luz en la reproducción de <i>Trichoderma</i> .....	19
2.2.0 Las proteínas BLR1 y BLR2: reguladores de la respuesta transcripcional de fotoconidiación en <i>T. atroviride</i> .....	22
2.3.0 Las etapas de formación del conidióforo están reguladas por factores de transcripción.....	24
2.4.0 Factores de transcripción de respuesta a luz encontrados en <i>T. atroviride</i> ..	26
<b>3.0.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVO DE TRABAJO</b> .....	<b>31</b>
3.1.0 Hipótesis .....	31
3.2.0 Objetivo general.....	31
3.3.0 Objetivos específicos .....	31
<b>4.0.0 MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>32</b>

4.1.0	Material orgánico y medio de cultivo .....	32
4.2.0	Obtención de mutantes por reemplazo génico de los genes <i>blu7</i> , <i>cóblu</i> y <i>sub1</i> .....	32
4.3.0	Manipulación de ARN y ADN.....	33
4.3.1	Validación de las mutantes por Southern blot .....	34
4.3.2	Análisis de la expresión de <i>blu7</i> por PCR-semicuantitativo.....	35
4.4.0	Caracterización fenotípica de las mutantes en respuesta a luz.....	35
4.4.1	Estimulación de la conidiación por pulsos de luz azul .....	36
4.4.2	Cultivo de las mutantes en luz constante .....	36
4.5.0	Análisis transcripcional de la mutantes $\Delta blu7$ en presencia de luz azul.....	37
4.6.0	Anotación funcional de los genes diferenciales .....	38
<b>5.0.0</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
5.1.0	Caracterización fenotípica en respuesta a luz de la mutante $\Delta c6blu$ .....	39
5.2.0	El gen <i>blu7</i> codifica para una proteína con dedos de zinc tipo C2H2 conservado en hongos filamentosos .....	41
5.3.0	Validación de las mutantes por Southern blot .....	43
5.4.0	Caracterización fenotípica de mutantes en <i>blu7</i> en presencia de luz azul	46
5.4.1	La fotoconidiación está disminuida en las mutantes $\Delta blu7$ .....	46
5.4.2	Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de las mutantes $\Delta blu7$ .....	48
5.4.3	La luz constante reduce el crecimiento en las mutantes de $\Delta blu7$ .....	49
5.5.0	Respuesta transcripcional de la mutante $\Delta blu7$ por el estímulo de 100 $\mu\text{molm}^{-2}$ de luz azul .....	51
5.5.1	La ausencia de <i>blu7</i> resulta en la alteración de la expresión de genes responsivos a luz.....	53
5.5.2	Las mutantes $\Delta blu7$ son severamente inhibidas en el crecimiento por luz en presencia de glucosa.....	55
5.5.3	La sobreexpresión de <i>blu7</i> aumenta la tolerancia a la luz constante. ....	58
5.5.4	La principal respuesta a luz constante requiere movilización del nitrógeno para el crecimiento.....	60
5.5.5	La regulación del crecimiento en presencia de luz es dependiente de la disponibilidad de nitrógeno. ....	63

5.6.0 Regulación negativa de la conidiación por <i>sub-1</i> , un posible interactor genético de <i>blu7</i> .....	64
<b>6.0.0 DISCUSIÓN .....</b>	<b>68</b>
6.1.0 Modulación de la conidiación por Blu7 a bajas fluencias de luz azul .....	68
6.2.0 Reducción del crecimiento por presencia de luz constante es aumentado por ausencia de blu7 .....	73
6.3.0 Factores adicionales que regulan la respuesta a luz.....	81
<b>7.0.0 CONCLUSIONES .....</b>	<b>86</b>
<b>8.0.0 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>87</b>
<b>9.0.0 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>88</b>
<b>10.0.0 ANEXOS .....</b>	<b>1</b>

## Resumen

La reproducción asexual de *Trichoderma atroviride* puede ser estimulada principalmente por daño mecánico, escases de nutrientes y luz. Las proteínas BLR1 y BLR2, son responsables de percibir la luz azul. El complejo BLR (BLRC), formado por BLR1 y BLR2, actúa como regulador transcripcional de genes de respuesta a luz. El gen *blu7*, dependiente del BLRC, que codifica para una proteína con dedos de zinc tipo C2H2 se identificó como probable factor de transcripción inducido por luz azul. Con el fin de conocer a mayor detalle del proceso de esporulación por la luz, decidimos caracterizar al gen *blu7*.

Las mutantes *blu7* mostraron menor conidiación a bajas fluencias de luz azul, e inclusive con dosis a saturación nunca alcanzaron la cantidad de esporas producidas por la cepa silvestre. La respuesta transcripcional de la mutante  $\Delta blu7$  después de un pulso de luz azul presentó categorías funcionales enriquecidas similares a las de la cepa silvestre. Sin embargo, los genes inducidos en la mutante fueron asociados a procesos de señalización, en tanto que los genes de la cepa silvestre a procesos de estrés, procesos metabólicos de compuestos nitrogenados y procesos biosintéticos. De manera interesante, bajo luz constante en medio mínimo la mutante presentó una mayor reducción del crecimiento radial que la silvestre de forma dependiente de la fuente de carbono. En condiciones de luz constante la mutante, cultivada en glucosa, presentó la inducción de genes asociados a la localización y el transporte de nitrógeno; por el contrario en la silvestre se reprimieron los genes asociados a esas categorías. En la cepa mutante se encontraron enriquecimiento de genes inducidos asociados a transportadores de aminoácidos, azúcares y transportadores generales, que por el contrario en la cepa silvestre fueron reprimidos. La restauración del crecimiento en luz constante por la adición

de peptona al medio de cultivo, sugiere que Blu7 está involucrado en la regulación del metabolismo de nitrógeno en presencia de luz.

Blu7 parece estar relacionado en la regulación de la intensidad de la respuesta de conidiación. Además, tiene un papel más importante en el crecimiento bajo luz constante. La disminución de la conidiación en la mutante  $\Delta\text{blu7}$  sugiere que se debe a la desregulación de la ruta de señalización por AMPc y la producción de EROs, mientras que la baja tolerancia a exposición de luz constante indica que Blu7 es requerido para la fotoadaptación.

## Abstract

The asexual reproduction of *Trichoderma atroviride* can be mainly stimulated by mechanical damage, carbon or nitrogen starvation and light. The BLR1 and BLR2 proteins are the photoreceptors that sense blue light variations. The BLRC complex, formed by the BLR1 and BLR2 proteins, act as a transcriptional regulator of light responsive genes both positive and negatively. The *blu7* gene expression is dependent of the BLR proteins. *blu7* encodes a zinc finger C2H2 type transcription factor protein. In order to get more detail of the light sporulation process we characterized this putative transcription factor.

The photoconidiation of the  $\Delta$ *blu7* mutants was reduced at low light fluences and even at saturating light fluence the sporulation never reached the spore production of the Wild Type. The transcriptional response of the mutants after a pulse of blue light presented similar biological process of GO terms both in the mutant and the WT. However, only genes induced in the mutant were related to signaling GO term, instead in the Wild Type, the light responsive genes were related to stress, nitrogen compound metabolic process and biosynthetic process GO terms mainly.

Furthermore, the  $\Delta$ *blu7* mutant showed reduced radial growth than the Wild Type under constant light on solid minimal media. The light responsive genes of the  $\Delta$ *blu7* mutant after 60 h of constant illumination on glucose as carbon source were related to localization and nitrogen transport GO categories, meanwhile in the WT the same categories were integrated by light repressed genes. Enrichment analysis of the induced genes in the mutant resulted in amino acids and sugar transporters that in the wild type were repressed. Radial colony growth of the mutant was restored by the addition of peptone to the media under constant light suggest that Blu7 is involved in the regulation of nitrogen metabolism.

Blu7 seems to be related to the regulation of the conidiation response to light intensity. On the other hand, under constant its role in the radial growth is more important. The deregulation of the cAMP signaling pathway and EROs production in the  $\Delta$ blu7 response to light might lead to a low spore production. While the low tolerance to constant light exposition of the mutants indicates that Blu7 is required in the photoadaptation process.

## 1.0.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1.0 Percepción de la luz en hongos: organismos con visión

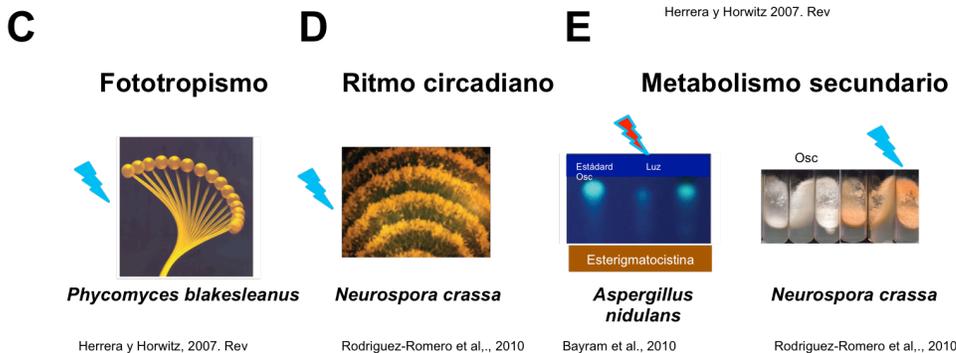
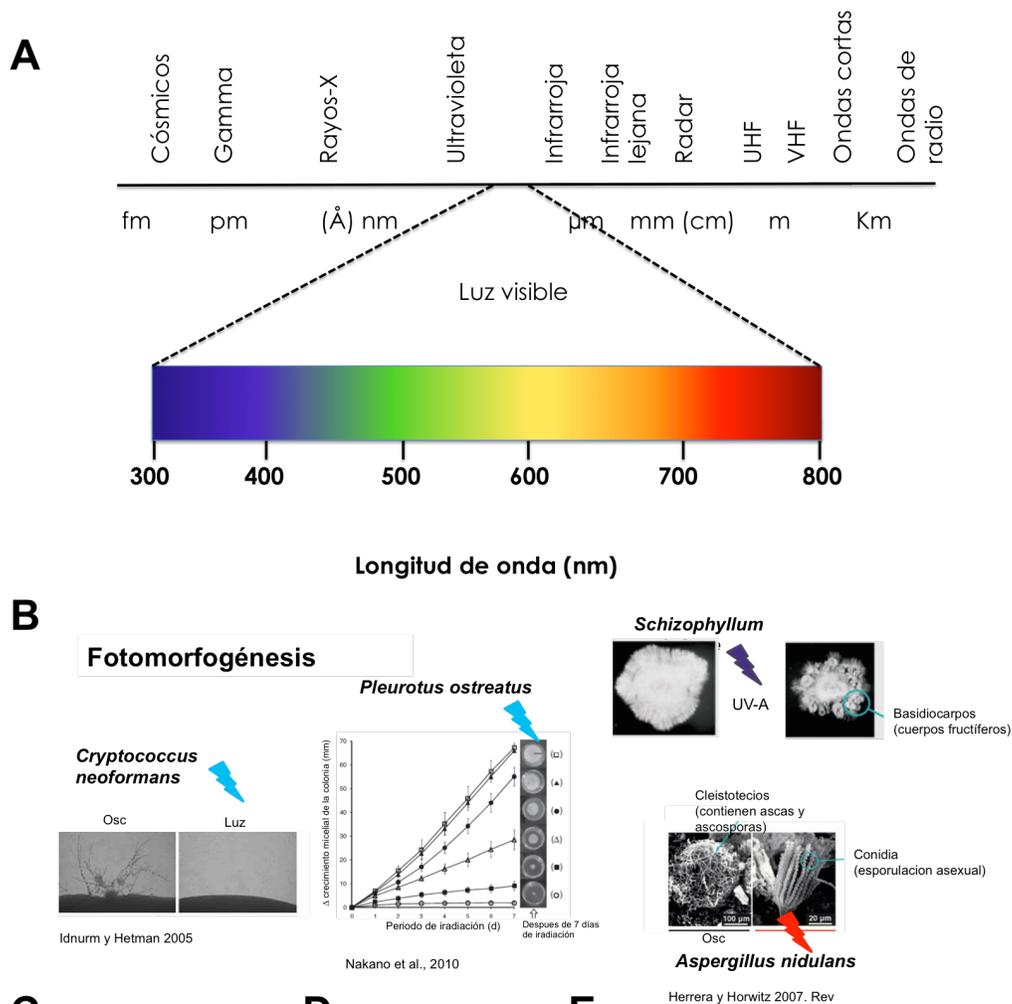
La mayoría de los organismos pueden percibir la luz y la respuesta a este estímulo es dependiente del tipo y la duración, que sirve como señal de los cambios del medio ambiente. Los hongos son organismos eucariontes, en su mayoría sésiles, que se dispersan como esporas en espera de las condiciones ambientales favorables para su germinación. La naturaleza saprofitica de la mayoría de ellos, los ubica debajo del suelo o dentro de la materia orgánica (Kredics et al. 2003; Klein y Paschke 2004; Rodríguez-Romero et al. 2010), lo que hace inevitable que tengan que enfrentar ambientes hostiles. Quizás el factor ambiental con mayor impacto es la luz solar, ya que aumenta el efecto de estrés oxidativo y por su gran energía radiante (luz UV) es capaz de modificar el ADN (Sancar y Sancar 1988; Rodríguez-Romero et al. 2010).

El espectro electromagnético del Sol incluye a todas las radiaciones electromagnéticas, y se clasifican de acuerdo a su longitud de onda. Del espectro, los seres vivos apenas perciben una pequeña región, que corresponde a la región visible (Fig. 1A).

En los hongos se han identificado complejos proteína-cromóforo denominados receptores de luz, que se especializan en percibir una determinada región del espectro electromagnético. Los fotoreceptores determinan la respuesta de acuerdo al tipo de luz (Corrochano 2007; Idnurm et al. 2010), ya que pueden percibir la luz roja (fitocromos), la luz verde (opsinas) y la luz azul-UV (criptocromos).

La reproducción tanto sexual como asexual de los hongos puede ser estimulada por la presencia de la luz tanto positiva (ejem. *Neurospora*, *Aspergillus*, *Trichoderma*) como negativamente (ejem. *Pleurotus ostreatus*, *A. parasiticus*) (Figura 2B). Además, algunos hongos son capaces de mover sus estructuras reproductivas hacia la fuente de

iluminación (Fig 2C). Así mismo, el ciclo circadiano regulado por la luz en los hongos dirige los periodos de formación de esporas asexuales (Fig 2D). Al mismo tiempo que, la iluminación altera el metabolismo secundario, al estimular la producción de pigmentos protectores como los  $\beta$ -carotenos (Fig. 2E) o la melanina.



**Figura 1.** Espectro electromagnético del Sol, con énfasis en la región del visible. A) Espectro electromagnético del Sol con una magnificación en la región del visible (de 300 a 800 nm). B) Estructuras de reproducción sexual y asexual producidas por la presencia de luz. C) Fototropismo positivo del esporangióforo de *Phycomyces*. D) Ritmo circadiano de la conidiación en *N. Crassa*, con los periodos naturales de luz y oscuridad de una mutante *bd*. E) Producción de esterigmatocistina por *A. nidulans* y acumulación de carotenos por *N. crassa* en presencia de luz. Tomado de Herrera-Estrella y Horwitz 2007; Rodriguez-Romero et al. 2010; Bayram et al. 2010).

### 1.1.1 Fotoreceptores de luz roja.

El fitocromo es un fotorreceptor que une un tetrapirrol lineal como cromóforo que le permite percibir a la luz roja o roja lejana. Los fitocromos de los hongos se encuentran más relacionado en estructura a los bacterianos que a los de plantas, ya que ambos presentan en la región carboxilo-terminal un dominio regulador de respuesta seguido por un dominio de cinasa de histidinas en la región amino-terminal (Blumenstein et al. 2005; Idnurm y Heitman 2005a). Se han identificado fitocromos en la mayoría de los hongos filamentosos ascomicetos, basidiomicetos y quitridiomycetos (Idnurm et al. 2010), aunque son pocos los organismos en los que se ha probado si participan en alguna respuesta a luz roja.

En *Aspergillus nidulans* el fitocromo PhyA regula la estimulación de la reproducción asexual por luz roja y reprime la reproducción sexual (Mooney y Yager 1990; Blumenstein et al. 2005). Además, controla la producción de la toxina esterigmatocistina, a través de su interacción con la metiltransferasa LaeA (Bayram, 2008), el cual es el regulador global de metabolitos en *Aspergillus* (Bok y Keller 2004). La regulación de la conidiación por PhyA en *Aspergillus* es compleja, ya que involucra la interacción con otras proteínas, entre ellas los receptores de luz azul LreA y

LreB (Light response A and B)(Calvo 2008; Purschwitz et al. 2008), los ortólogos a los receptores de luz azul WC-1 y WC-2 de *N. crassa*. De forma similar para la regulación de metabolitos secundarios, PhyA interactúa con el complejo Velvet, que además regula negativamente la formación de estructuras reproductivas asexuales en presencia de luz (Purschwitz et al. 2008).

En *N. crassa* se encontraron dos genes que codifican fitocromos, *phy-1* y *phy-2* (Froehlich et al. 2005). Aunque, las mutantes de estos genes presentaron un fenotipo similar que la cepa silvestre en el crecimiento o el desarrollo, el análisis de la respuesta transcripcional de las mutantes en presencia de luz, mostró alteraciones en la expresión de un tercio del genoma (Wang et al. 2016). En nuestro modelo de estudio, *Trichoderma atroviride* se ha reportado la disminución en el crecimiento por la presencia de luz roja en ausencia de los genes *blr1* o *blr2*, lo que indica una posible función del fitocromo (Casas Flores et al. 2004). En el genoma de *T. atroviride* hay dos genes que codifican para los fitocromos *phy1* y *phy2*, para los cuales aún no se ha caracterizado su función, ya que la ausencia de uno de los fitocromos no mostró alteraciones en la respuesta a luz roja o roja lejana.

### **1.1.2 Fotorreceptores de luz verde**

Las opsinas son proteínas con siete dominios transmembranales que unen retinal como cromóforo. Estas proteínas fueron inicialmente encontradas en bacterias como transportadores de protones de manera dependiente de la luz (Spudich et al. 2000). Así mismo, en el alga *Chlamidomonas reinhardtii* se reportó que estas proteínas pueden funcionar como receptores de luz verde (Sineshchekov et al. 2002). En el hongo *Lepstosphaeria maculans* se probó que pueden actuar como una bomba de protones (Waschuk et al. 2005). Por otro lado, en el ascomiceto

*Neurospora crassa*, estudios con mutantes de la opsina ( $\Delta nop-1$ ), mediante microarreglos no fueron suficientes para encontrar genes relacionado con la respuesta a luz verde y las mutantes tampoco mostraron ningún fenotipo (Bieszke et al. 1999; Chen et al. 2009). Recientemente, en *Fusarium fujikuroi* se reportó una función para la rodopsina CarO como transportador de protones estimulado por luz. Además, en presencia de luz las germínulas de la mutante  $\Delta carO$  se desarrollaron mucho más rápido que la cepa silvestre, mientras que en oscuridad mostró el mismo comportamiento que la cepa silvestre (García-Martínez et al. 2015). De manera interesante, se determinó que, carO está presente en hongos asociados con las plantas, lo que sugiere una posible función en interacciones planta-hongo.

En nuestro modelo de estudio *T. atroviride* se identificó un gen que codifica para una opsina que tiene similitud a bacteriodopsinas. Interesantemente en *T. vires* o *T. reesei* no presentan en su genoma una copia de este gen (Schmoll et al. 2010). Análisis filogenéticos de las opsinas de hongos señalan que la presencia de este gen fue debido a transferencia horizontal, lo que explica el por qué en especies de hongos cercanos no presentan un gen que codifique opsina en sus genomas (Ruiz-González y Marín 2004; Sharma et al. 2006).

### **1.1.3 Fotorreceptores de luz azul**

Los criptocromos son fotorreceptores de luz azul/UVA que se encuentran relacionados a las enzimas ADN fotoliasas que reparan el daño en el ADN generado por la luz UV, las cuales conforman una gran familia de proteínas Criptocromo-Fotoliasas. Esta familia de proteínas se clasifican en tres grandes categorías: 1) Las CPD-fotoliasas que reparan dímeros de ciclobutilpirimidina, 2) Las 6-4 PPs fotoliasa que reparan los fotoproductos 6-4 pirimidina-pirimidona y 3) los criptocromos (cry). Los CRY a su vez pueden dividirse en tres categorías de acuerdo a su homología con los

criptocromos de las plantas, animales y Cry-DASH (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* y *Homo*). Se ha reportado que en las plantas las proteínas CRY están implicados en la regulación de varios procesos del crecimiento y el desarrollo (Fankhauser y Staiger 2002; Gyula et al. 2003; Chen et al. 2004), en tanto que en los animales tienen un rol en la regulación del ciclo circadiano y en la magnetorecepción en los insectos y las aves migratorias (Losi y Gärtner, 2012; Chaves, 2011).

Inicialmente se reportó que una gran diferencia de los criptocromos con las fotoliasas, es que en los criptocromos la actividad de fotoreparación del ADN parece perdida, que es recompensado por la ganancia de función en procesos de señalización en los CRY. Sin embargo en hongos, se ha observado actividad de fotoliasa en proteínas tipo CRY (Bayram et al. 2008a; Guzmán-Moreno et al. 2014; García-Esquivel et al. 2016).

La presencia de criptocromos en el dominio de los hongos es disperso, ya que se han observado solo en algunos ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos (Idnurm et al. 2010). En *A. nidulans* la mutante del criptocromo  $\Delta cryA$ , que codifica a una proteína muy similar a las CPD-fotoliasas, permite la formación de células "Hüll" en medio líquido, condición que normalmente la reprime; además ha mostrado actividad de reparación de daño al ADN cuando se expresa en *Escherichia coli*. Esto sugiere una participación en la regulación negativa por la luz en la reproducción sexual y su actividad de fotoliasa (Bayram et al. 2008a).

En *N. crassa* la ausencia de *cry-1* (cry-DASH) no presentó ningún fenotipo en respuesta a la luz, ni se reportó actividad de fotoliasa (Froehlich et al. 2010). Sin embargo, estudios recientes muestran que la función de CRY-1 esta enmascarado por la presencia de los WC-1 y de FRQ, ya que en las mutantes *wc-1* o *frq*, se observó un mecanismo oscilador para el desarrollo de las esporas y requiere la presencia de CRY1-1 (Nsa et al. 2014).

En *T. reesei*, el criptocromo CRY1 (6-4 fotoliasa) tiene actividad de fotoreparación de 6-4 PP y es regulado por BLR1 y Env1 en presencia de luz (Guzmán-Moreno et al. 2014). En tanto que CRY1 (CPD-fotoliasa) de *T. atroviride* además del presentar un rol en la fotoreparación de daño a ADN, está involucrado en la regulación de genes responsivos a luz, independientes de BLR1 (García-Esquivel et al. 2016). Con excepción de *A. nidulans*, no se ha identificado un fenotipo obvio por la ausencia de miembros de la familia criptocromo/fotoliasa en otros hongos.

El fotorreceptor más estudiado en los hongos, hasta ahora, es la proteína White Collar-1 (WC-1) de *N. crassa* que regula casi todas las respuestas a luz en este hongo (Harding y Melles 1983; Ballario et al. 1996). La proteína WC-1 contiene tres dominios PAS, uno de ellos caracterizado como LOV (Light-Oxygen-Voltage) que une el cromóforo FAD que percibe la luz en *N. crassa*. Además presenta en la región C-terminal un dominio tipo GATA con el que se une a promotores de genes responsivos a luz (Froehlich et al. 2002; Smith et al. 2010). Análisis filogenéticos de las proteínas WC muestran que está relacionado con los fotorreceptores tipo fototropinas de plantas. La proteína WC-1 actúa como fotorreceptor de luz azul al unir el cromóforo FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) en su dominio LOV. WC-1 interactúa con WC-2 (White Collar-2), a través de un dominio PAS (PER-ARNT-SIM) que contienen ambas proteínas, para formar el complejo WCC (Ballario et al. 1998). Ambas proteínas contienen un dominio de unión a ADN tipo dedo de zinc clase II (GATA), por lo actúan como receptores de luz azul y factores transcripcionales por si mismos (Ballario et al. 1996).

En el zigomiceto *Phycomyces blakesleeanus*, las proteínas WC regulan el fototropismo de los esporangióforos en respuesta a la luz azul (Galland y Lipson 1987); respuesta que también se ha observado en *Mucor circinelloides* (Silva et al. 2006). Además participan en la producción de  $\beta$ -carotenos y en la regulación del ciclo circadiano en estos organismos

(Corrochano y Garre 2010). A diferencia de los ascomicetos, en los basidiomicetos y los zigomicetos se han identificado más de una copia de *wc-1* y *wc-2* en sus genomas (Idnurm et al. 2010). En *M. circinelloides* se ha observado que cada copia tiene una función independiente e inclusive pueden regular respuesta en intervalos de luz verde (Silva et al. 2006).

En el ascomiceto *N. crassa* la producción de conidias (esporas asexuales), la síntesis de carotenos en el micelio, el fototropismo de los picos de los peritecios (estructuras sexuales), así como la entrada y reprogramación del ciclo circadiano es controlada por las proteínas WC (He et al. 2002; Chen et al. 2010). En el ascomiceto *A. nidulans* la interacción del fotorreceptor de luz roja FphA y el de luz azul, formado por los ortólogos de WC-1 y WC-2 de *N. crassa* (LreA, LreB), ha sido mostrada por medio de análisis de dos híbridos e inmunoprecipitaciones (Purschwitz et al. 2009). Además, se encontró que forman parte de un complejo proteínico Velvet (VelB-VeA-LaeA) que involucra proteínas controladoras de la reproducción sexual/asexual y de la producción de metabolitos secundarios en varios hongos (Calvo 2008; Bayram et al. 2008b).

### **1.2.0 Regulación de las respuestas a luz en hongos filamentosos**

La luz desencadena en los hongos una gran cantidad de respuestas, como el fototropismo, la reproducción, cambios en el metabolismo y regulación del ciclo circadiano (Herrera-Estrella y Horwitz 2007; Rodríguez-Romero et al. 2010; Bayram et al. 2010). En casi todo el reino de los hongos se han reportado cambios en el comportamiento por la presencia de luz, aunque algunos son tan sutiles que no se logran ver fenotípicamente (Robertson et al. 2013; Hurley et al. 2014; Hevia et al. 2015).

El ciclo circadiano es un proceso conservado en la mayoría de los organismos (Wijnen y Young 2006). El reloj circadiano permite sincronizar la respuesta de los hongos con los cambios de luz y temperatura del

ambiente. Este comportamiento se ha estudiado más en el ascomiceto *N. crassa* (Lombardi y Brody 2005; Baker et al. 2011; Schafmeier y Diernfellner 2011), ya que una mutación en la proteínas G tipo RAS permitió la medición fenotípica del ciclo circadiano a través del bandeo de conidiación (Belden et al. 2007). Además, la formación de  $\beta$ -carotenos en las conidias de *N. crassa* también es regulado por el reloj biológico. Estudios más recientes con secuenciación masiva han mostrado que una gran cantidad de genes relacionados al metabolismo son controlados por medio del reloj circadiano, el cual es regulado a través del complejo fotoreceptor WCC (Haydon et al. 2013; Sancar et al. 2015). De manera interesante, la respuesta transcripcional durante la fase diurna favorece el catabolismo, en tanto que la fase nocturna el anabolismo (Hurley et al. 2014).

### **1.2.1 Regulación del fototropismo**

El fototropismo se refiere a la respuesta que tiene un organismo para orientarse y moverse hacia una fuente de iluminación. Este comportamiento ha sido ampliamente descrito en plantas y la percepción de la luz en este caso es a través de las fototropinas. El movimiento del tallo por la presencia de luz es mediado por la acumulación de los reguladores de crecimiento tipo auxinas en la parte posterior de la fuente de iluminación, lo que permite un crecimiento asimétrico. En *Arabidopsis thaliana* este proceso requiere de las fototropinas Phot1 y Phot2 (Christie 2007).

En los hongos el principal modelo de estudio del fototropismo es el zigomiceto *Phycomyces blakesleanus* (Galland, 1990; Bergman, 1969). Los esporangióforos de *P. blakesleanus* tienden a dirigirse hacia la fuente de iluminación, y se requiere de poca cantidad de luz azul para ello, en tanto que la luz UV provoca un efecto contrario (Galland 1990). El fotorreceptor asociado a las repuestas trópicas está formado por las proteínas MadA y

MadB (Sanz et al. 2009), los homologas a los WC-1 y WC-2 de *N. crassa*. *P. blakesleanus* presenta 3 copias de *wc-1* y 4 copias del gen *wc-2* en su genoma, sin embargo solo las mutantes en *madA* y *madB* han sido caracterizadas (Corrochano y Garre 2010). La ausencia de *madB* en *P. blakesleanus*, elimina la respuesta trópica a luz de los esporangióforos. Además, se observó que MadB es capaz de interactuar con MadA en ensayos de dos híbridos, lo que sugiere la formación de un complejo fotorreceptor MAD (Sanz et al. 2009). Por otro lado, los esporangióforos de *Mucor circinelloides* presentan fototropismo positivo (Silva et al. 2006). A diferencia de *P. blakesleanus*, en *M. circinelloides* el fototropismo de los esporangióforos es estimulado por luz azul y verde (Silva et al. 2006). La caracterización fenotípica de las mutantes en los tres ortólogos a *wc-1* de *N. crassa*, resultó en una regulación diferencial de las respuesta a luz. La biosíntesis de  $\beta$ -carotenos fue reducida en la mutante de *mcwc-1c*, en tanto que el fototropismo fue bloqueado en la mutante *mcwc-1a* (Silva et al. 2006). En el zigomiceto *Pilobolus crystallinus* se ha reportado tropismo positivo de los esporangióforos hacia la luz azul (Kubo y Mihara 1986; Kubo y Mihara 1988), sin embargo no se han caracterizado las fotoreceptores asociados a la respuesta. El genoma de *P. crystallinus* presenta los genes *white collar*, que codifican proteínas con los dominios de unión a ADN tipo GATA y los dominios PAS tipo LOV para percibir la luz (Kubo 2009). En el hongo ascomiceto *N. crassa* se ha reportado fototropismo de la puntas periteciales por la presencia de la luz, la cual es perdida por la ausencia de los genes *wc-1* o *wc-2* (Harding y Melles 1983). A pesar de que en *N. crassa* el complejo fotorreceptor WCC ha sido ampliamente estudiado en la reproducción sexual y asexual, poco se sabe sobre su desempeño en el fototropismo.

### 1.2.2 Regulación del metabolismo

Dentro de la gama de respuestas en los hongos que son afectadas por la energía radiante del sol se encuentran el metabolismo primario y el metabolismo secundario. En varios modelos fúngicos la formación de carotenoides es inducida por la presencia de luz. Los genes que codifican para la biosíntesis de carotenoides en *N. crassa*, *P. Blakesleanus*, *M. circinelloides* y *Gibberella fujikuroi* son inducidos por la iluminación (Harding y Turner 1981; Bejarano et al. 1990; Estrada y Avalos 2008).

En el ascomiceto *N. crassa* la producción de  $\beta$ -carotenos en el micelio requiere de los productos de los genes *albino al-1* (desaturasa), *al-2* (fitoeno sintasa) y *al-3* (prenil transferasa), cuya expresión es dependiente de la luz en micelio (Harding y Turner 1981). La expresión de *al-1*, *al-2* y *al-3* es controlada por los fotoreceptores y factores de transcripción WC-1 y WC-2 (Ballario et al. 1996), y su ausencia bloquea la formación de estos pigmentos color naranja. En *P. blakesleanus* MadA y MadB, los ortólogos a WC-1 y -2 de *N. crassa*, controlan la síntesis de carotenos en este zigomiceto (Bejarano et al. 1990), por lo que posiblemente sean los responsables del control de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de estos compuestos. De manera similar, en *M. circinelloides*, la biosíntesis de  $\beta$ -carotenos fue reducida en la mutante de *mcwc-1c* (Silva et al. 2006). Por otro lado, McwC-1b en conjunto con la ubiquitin ligasa CrgA, regulan la biosíntesis de  $\beta$ -carotenos de forma independiente de *mcwc-1c* (Silva et al. 2006), lo que sugiere una especialización de estas proteínas para las respuestas a luz. Por el contrario, en *G. fujikuroi* la expresión de *carRA*, *carB* y *carT*, que codifican enzimas involucradas en formación de carotenos, es independiente de WcoA (Estrada y Avalos 2008), el ortólogo a WC-1 de *N. crassa*. De manera interesante, se observó que la expresión de *carRA*, así como de otros genes, puede ser estimulada por la luz roja; lo que indica que la regulación de la carotenogénesis

puede ser también controlada por un receptor de luz roja (Castrillo y Avalos 2015).

En *A. nidulans*, se demostró mediante análisis de dos híbridos que la proteína Velvet (VeA) actúa como centro de anclaje para el complejo Velvet (formado por LaeA, una metil transferasa y VelB (Velvet-B)), el cual es ensamblado en la oscuridad para la regulación de la reproducción sexual y la formación de esterigmatocistina en *A. nidulans* (Bayram et al. 2008b). En tanto que en presencia de la luz, únicamente se ha observado la presencia del complejo dimérico VelB-VeA, retenido en el citoplasma, lo que disminuye la formación de la toxina y estimula la formación de esporas asexuales. El complejo proteico Velvet interactúa con el fitocromo FphA, el cual a su vez interactúa con LreB, homólogo de WC-2 de *N. crassa* (Calvo 2008), lo que vincula la percepción de la luz con la reproducción y la formación de metabolitos secundarios en especies de *Aspergillus*.

El gen velvet se encuentra en los genomas de varios hongos filamentosos, el cual conserva una función en la reproducción. En *T. virens* (Mukherjee y Kenerley 2010) y *T. atroviride* (Cetz-Chel y Herrera-Estrella 2009) la ausencia de velvet resultó en la reducción de hifas aéreas y de las hifas vegetativas, que no mostraron estructuras asexuales, así mismo las cepas mutantes presentaron metabolismo secundario disminuido. Lo que sugiere que Velvet de *Trichoderma* interviene en más procesos que en las especies de *Aspergillus*.

La regulación de la asimilación de nutrientes, sobre todo de la fuente de carbono, por la presencia de la luz ha sido ampliamente documentada en los hongos (Tisch y Schmoll 2009). Varios organismo fúngicos presentan mayor crecimiento y asimilación de glucosa en la oscuridad que las expuestas a iluminación. En *Aspergillus onatus* el consumo de glucosa es inhibida en presencia de luz, así como el crecimiento. En tanto que si se añade lisina al medio de cultivo la toma de esta fuente de carbono (y

nitrogéno) es similar que en oscuridad (Hill 1976). En este sentido, se ha observado que en presencia de luz los metabolitos iniciales de la ruta de la glicolisis (Glucosa-6-fosfato, Fructosa-6-fosfato, gliceraldehido-3-fosfato y dihidroacetona fosfato) se incrementan, en tanto que los metabolitos posteriores al rompimiento de la fructosa 1,6 bifosfato (2-fosfoglicerato, fosfoetanol piruvato y piruvato) disminuyen (Graafmans 1977; Ram et al. 1984; Rua et al. 1987; Tisch y Schmoll 2009).

La regulación negativa de la asimilación de la glucosa en presencia de luz correlaciona con la producción de la conidias en *N. crassa*. De tal manera que la ausencia de transportadores de glucosa puede alterar el patrón de bandeado de la conidiación (Halaban 1975), lo cual sugiere que una señal de deficiencia de carbono es estimulada en presencia de luz.

En otro caso, colonias de *T. atroviride* crecidas en glucosa y transferidas repentinamente a medio mínimo sin fuente de carbono muestran formación de conidias en las hifas más jóvenes que se encuentran en la periferia de la colonia (Casas-Flores et al. 2006), que asemejan al patrón observado por un pulso de luz (Galun y Gressel 1966). De manera interesante, en ausencia de las proteínas BLR1 o BLR2 se pierde la inducción de la conidiación por carencia de glucosa, sin embargo la adición de AMPc al medio es capaz de restablecer la conidiación. Lo que sugiere en carencia de glucosa BLR1 o BLR2 se requieren para la generación de AMPc, por un mecanismo aún desconocido. En relación a este fenómeno, también se ha observado que en presencia de luz hay incrementos rápidos en los niveles de ATP y AMPc (Grešík et al. 1989). Se presume que la iluminación acelera la respiración lo que da lugar a los incrementos de ATP (Šulová et al. 1990) . En la levadura *S. cerevisiae* la luz puede desencadenar respuestas, a través de la inhibición de la cadena de transporte de electrones vía los citocromos, sin la intervención de un fotorreceptor. Lo que da como resultado una alteración del ritmo

ultradiano, que modifica el proceso de respiración en esta levadura (Robertson et al. 2013).

Por otro lado en el ascomiceto *N. crassa* se han encontrado cambios post-transcripcionales de enzimas relacionadas al metabolismo durante el ciclo circadiano (Hurley et al. 2014). En este caso, durante la fase diurna el catabolismo, la producción de energía y ensamble de precursores son los términos preponderantes, en tanto que durante la fase nocturna los procesos asociados a la biosíntesis de componentes celulares y crecimiento son mayor representados en los genes regulados por el reloj circadiano (Hurley et al. 2014). De manera interesante, aquellos genes regulados por los WC fueron encontrados en el amanecer relativo (Sancar et al. 2015). Lo que nos indica la íntima relación que tienen estos fotorreceptores en los procesos metabólicos durante el cambio de fase de iluminación.

### **1.2.3 Regulación de la reproducción sexual y asexual**

La formación de esporas sexuales y asexuales es estimulada por varios factores ambientales, entre ellos la luz (Perkins y Gordon 1969; Adams et al. 1998; Chitarra et al. 2004). La exposición del micelio del basidiomiceto *Schizophyllum* a luz ultravioleta-A (UVA) induce la formación de las estructuras sexuales, denominados cuerpos fructíferos (Perkins y Gordon 1969). En el ascomiceto *N. crassa*, la luz azul aumenta la producción de esporas asexuales estimulando la formación del conidióforo y sus estructuras de reproducción sexual (peritecios) presentan fototropismo positivo de sus puntas. Estas respuestas son reguladas por las proteínas White Collar (Harding y Melles 1983; Ballario et al. 1996).

A diferencia de *N. crassa*, el ascomiceto *A. nidulans* responde a luz roja/roja lejana para regular la reproducción sexual y asexual (Mooney y Yager 1990; Blumenstein et al. 2005). Para ello utiliza el fitocromo FphA

como receptor de luz, el cual, como ya se dijo, interacciona con varias proteínas, entre ellas las proteínas LreA y LreB (Blumenstein et al. 2005; Purschwitz et al. 2008). En este caso, tanto la luz roja como la azul estimulan la formación de conidióforos, en tanto que la formación de cleistotecios, estructuras sexuales es inhibida. La conidiación se ve disminuida en mutantes del fitocromo de *A. nidulans*, sin embargo, solo es abatida en una mutante triple del fitocromo y de los genes *lreA* y *lreB* (Purschwitz et al. 2008), lo que indica que los receptores de luz pueden actuar de forma independiente y en forma de complejo (Calvo 2008).

En el zigomiceto *P. blakesleanus* la formación de estructuras asexuales llamadas macroesporas es estimulada por la luz, mientras que las microesporogénesis es inhibida (Bergman et al. 1969). La percepción de la luz es a través del fotorreceptor de luz azul MadA en combinación con MadB regula positivamente la esporogénesis, así como el fototropismo de los esporangióforos (Bergman et al. 1969; Galland 1990; Sanz et al. 2009).

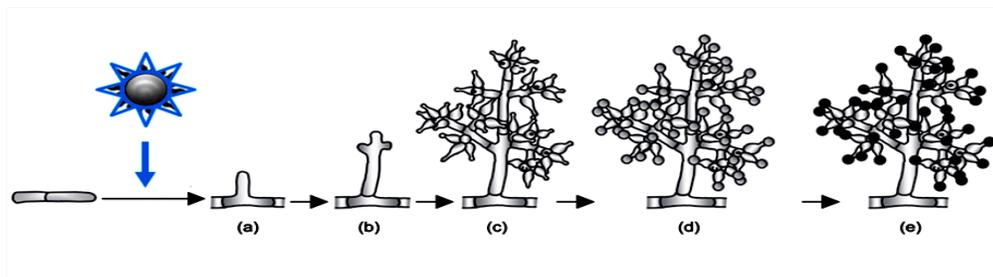
## **2.0.0 ANTECEDENTES**

### **2.1.0 Efectos de la luz en la reproducción de *Trichoderma***

*T. atroviride* es un reconocido agente de biocontrol de hongos fitopatógenos muy utilizado en campos agrícolas y aplicado como formulaciones de esporas asexuales (Benítez et al. 2004; Schuster y Schmoll 2010). Debido a su capacidad para formar estructuras de reproducción en respuesta a luz *T. atroviride* ha sido utilizado como modelo para el análisis molecular de la percepción de la luz y de la fotomorfogénesis (Galun y Gressel 1966; Galun 1971; Schmoll et al. 2010).

Un pulso de luz sobre el micelio es suficiente para estimular la formación de esporas asexuales justo en el frente de la colonia, formando un anillo de conidiación. Los cambios morfológicos en *Trichoderma* debidos a un pulso

de luz son tan rápidos (Fig. 2), que después de 3 h de haber percibido el estímulo, se pueden observar hifas aéreas nuevas en el frente de la colonia (Galun 1971), las cuales forman ramificaciones después de 6-8 h. Pasadas las 12h se observan los primeros conidióforos que contienen esporas hialinas, que se pigmentan de color verde a partir de 16 a 18 h. Finalmente a las 24 h, las esporas se encuentran maduras, con su coloración verde olivo característica [Fig. 2; (Gressel y Galun 1967)].



**Figura 2. Esquema de la formación del conidióforo en *Trichoderma* después de un pulso de luz (Betina, 1984).** Un pulso de luz sobre el micelio de *Trichoderma* forma hifas aéreas nuevas en el perímetro de la colonia después de 4 h (a). Pasadas 8 h se pueden observar las fiálides (b), las estructuras que soportaran a las conidias. A las 12 h se observa el conidióforo inmaduro (c), que a las 16 h ya ha formado las esporas o conidias inmaduras (d). Finalmente las conidias maduras claramente visibles por la pigmentación verde se observas después de 24 h (e).

El recambio transcripcional (cambios en los distintos mARN) y traduccional (cambios en las distintas proteínas) para la formación del conidióforo estimulado por luz (fotoconidiación) en *T. atroviride* se lleva a cabo en las primeras 8 h después del estímulo (Gressel y Galun 1967; Betina y Spisřaková J 1976). Tal como lo muestran ensayos con inhibidores de la síntesis de novo de mARN (p.e. 5-fluoracilo) o de proteínas [p.e. cicloheximida; (Betina y Spisřaková J 1976)]. Estos ensayos mostraron que la aplicación del inhibidor de las 0 a 8 h, después del estímulo de luz, la formación del anillo de

conidiación -característico de *Trichoderma*- es imperceptible. Cuando el inhibidor fue añadido después de 8 h del estímulo, el anillo de conidiación fue completamente formado, lo que indica un periodo de formación de moléculas necesarias para la esporulación.

Las proteínas BLR1 y BLR2 de *T. atroviride*, son responsables de percibir la señal de luz azul para la esporulación asexual (Casas Flores et al. 2004). Estas proteínas presentan los mismos dominios que los ortólogos WC-1 y WC-2 de *N. crassa* (Casas Flores et al. 2004). Ambas proteínas son necesarias para la fotoconidiación en *T. atroviride*, lo que sugiere la formación de un complejo para la regulación de la esporulación asexual.

El análisis de la conidiación de las mutantes  $\Delta blr-1$  y  $\Delta blr-2$  en diferentes fuentes de carbono en luz y oscuridad, mostró que algunas fuentes de carbono permiten la formación de esporas asexuales sin el estímulo de la luz, en tanto que otras necesitan la presencia de BLR-1 ó BLR-2 (Friedl et al. 2008a) (Friedl et al. 2008a). En el mismo estudio mostraron que la aplicación exógena de cAMP (cyclic Adenine Monophosphate) induce y reprime la producción de conidias de forma dependiente de la fuente de carbono y de las proteínas BLR (Friedl et al. 2008a), ligando la respuesta a luz y el metabolismo del carbono en *T. atroviride*.

Otras respuestas asociadas a luz, menos evidentes en *Trichoderma*, involucran cambios bioquímicos y metabólicos. Como la hiperpolarización de la membrana plasmática (Grešik et al. 1991), incrementos en los niveles de ATP (Adenosine Triphosphate), incrementos en la actividad de la adenilato ciclasa, incrementos en la actividad de la proteína cinasa A, oscilación transitoria de cAMP y fosforilación de proteínas (Grešik et al. 1988; Grešik et al. 1989). Así mismo la producción del peptaibol atroviridina y la producción de celulasas son estimuladas por la luz (Komon-Zelazowska et al. 2007; Schmoll et al. 2010), los cuales tienen un impacto en la formación de las conidias.

## **2.2.0 Las proteínas BLR1 y BLR2: reguladores de la respuesta transcripcional de fotoconidiación en *T. atroviride***

Estudios transcriptómicos iniciales con las mutantes  $\Delta blr1$  o  $\Delta blr2$  mostraron la pérdida de regulación de genes inducidos o reprimidos después de 30 min de un pulso de luz blanca (Rosales-Saavedra et al. 2006). El estudio realizado por Rosales et al., (2006), reportó 40 genes regulados diferencialmente, de los cuales 30 fueron inducidos y 10 reprimidos. La anotación funcional de los genes, mostró que el gen *blu7* codifica para una proteína con un dominio de dedos de zinc tipo C2H2 conservado..

El análisis también mostró que la *Fotoliasa-1* (*phr-1*) fue uno de los genes con mayor inducción. Este gen se ha visto expresado tanto en micelio como en conidias, probablemente como una defensa contra los daños por luz en el ADN (Berrocal-Tito et al. 2000). Así mismo se encontraron proteínas receptoras de membrana (dominio CFEM), proteínas del transporte de péptidos, transportadores de azúcares y proteínas hipotéticas, principalmente (Rosales-Saavedra et al. 2006).

Recientemente se realizó un análisis del transcriptoma en respuesta a un pulso de luz blanca después de 30 min, por medio de pirosecuenciación 454 (García-Esquivel et al. 2016). Fueron encontrados 331 genes regulados por luz, de los cuales 178 genes fueron inducidos y 153 fueron reprimidos en estas condiciones. Así mismo, se encontraron 70 genes independientes de BLR-1. Una cantidad considerable de genes (39 de 178) inducidos fueron relacionados a la respuesta al estrés. Como se esperaba, también se encontraron FsT regulados por un pulso de luz, 9 inducidos y 3 reprimidos (Tabla 1). De los cuales, los genes *sah1*, y *cp2* también han sido encontrados como regulados por luz en *N. crassa* y a ninguno de ellos se les han atribuido función alguna en respuesta a luz. Sin embargo, la

mutantes nula del gen *sah1* mostró una reducción de las hifas aéreas (Colot et al. 2006), sin alterar la esporulación asexual, con la variación de la expresión de algunos genes de respuesta a luz (Chen et al. 2009).

Estudios transcripcionales en *N. crassa*, por microarreglos y secuenciación masiva, han mostrado la regulación de 24 factores de transcripción dependientes WC-2 (Smith et al. 2010), de los cuales se han realizado mutantes en la mayoría, pero solamente a 6 de ellos se les ha analizado su respuesta transcripcional. Únicamente *sub-1* (*submerged protoperithecia-1*) mostró el perfil esperado de regulación en cascada, al ser responsable de la inducción de genes de respuesta tardía a luz (Chen et al. 2009) (Chen, 2009). Sin embargo, la ausencia de genes como *sah-1*, *vad-3*, *csp1* o *NCU03643.2* también mostraron ser requeridos para modular la expresión de genes tempranos o tardíos aunque en menor grado (Chen et al. 2009). Mutantes de *sub-1* mostraron una conidiación similar a la cepa silvestre y anormal aparición de protoperitecios en medio sumergido, lo que sugiere que es un regulador negativo en la reproducción sexual (Colot et al. 2006). El fenotipo de la mutante  $\Delta$ *sah-1* mostró una reducción en la longitud de las hifas aéreas, siendo más cortas que la cepa silvestre, pero sin efecto en la conidiación. La ausencia de *vad-3* resultó en crecimiento reducido de hifas basales y de hifas aéreas, además de defectos en el desarrollo asexual (Colot et al. 2006). Sin embargo, en respuesta a un pulso de luz blanca mostró un fenotipo similar que la cepa silvestre y algunos genes de respuesta temprano con mayor inducción (Chen et al. 2009).

En tanto que *csp1* ha sido vinculado con la formación correcta del conidióforo, participando en el control del longitud de separación de las conidias que permiten su correcta liberación (Selitrennikoff et al. 1974), no obstante pocos genes son alterados por un pulso de luz en la mutante (Chen et al. 2009).

Recientemente, se demostró en *A. nidulans* que las proteínas LreA y LreB, ortólogos a los WC1 y WC2 de *N. crassa*, junto con el fitocromo FphA controlan la expresión de FT como *brlA* (*bristleA*), *abaA* (*abacusA*) y *wetA* (*wet-white*), a través de la inducción de *flbC*, que codifica un FT con dedos de zinc tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Ruger-Herreros et al. 2011). La expresión de *flbC* es regulada por luz y requiere de la presencia del complejo proteico formado por los fotorreceptores de luz azul y roja (Ruger-Herreros et al. 2011). Una vez que FlbC está presente, activa la expresión de *brlA* de forma dependiente de la luz, dando lugar a la formación del conidióforo. De esta manera las etapas de formación del conidióforo de *A. nidulans* son controladas por estos FT, por regulación temporal secuencial.

El control de la fotoconidiación por el BLRC en *T. atroviride* esconde todavía a los actores subsiguientes en la cascada transcripcional. Aunque de los estudios hechos en *N. crassa* y *A. nidulans* observamos FT conservados, la falta de estudios transcripcionales de mayor profundidad en *Trichoderma* los han confinado al anonimato. Por ello, retomando los estudios hechos por Rosales y colabores (2006), hipotetizamos que los FT de transcripción regulados por el BLRC regulan las etapas de formación del conidióforo, uno de ellos el probable FT Blu7 regulado en tiempos tempranos después del estímulo luminoso.

### **2.3.0 Las etapas de formación del conidióforo están reguladas por factores de transcripción**

La diferenciación del micelio que da lugar a la esporulación asexual ha sido mejor estudiada en *A. nidulans*, donde se pueden distinguir varias fases morfológicas para formar el conidióforo. En primer lugar, al percibir el estímulo de luz la hifa aérea, da lugar a un tallo largo que se ensancha y forma una vesícula que posteriormente desarrollará las métulas. Estas estructuras forman la base de soporte de las filíades; las cuales se

diferencian para dar lugar a la formación de cadenas de conidias (Adams et al. 1998).

En *A. nidulans* se han identificado tres genes responsables de la formación del conidióforo, los cuales son inducidos por luz y regulados secuencialmente (Boylan et al. 1987). En la fase inicial de la conidiación el factor de transcripción tipo dedos de Zinc clase I (C2H2) BrlA, comienza el cambio de la hifa aérea a base del conidióforo. En la fase intermedia el FT AbaA, que contiene un dominio de unión a ADN similar al factor TEF-1 que se une al enhancer 40 encontrado en virus, es necesario para la formación correcta de las mótulas. En tanto que el gen *wetA* codifica para una proteína requerida para la maduración de las esporas, sin embargo no tiene similitud con proteínas de función conocida (Boylan et al. 1987; Adams et al. 1998).

Una gran cantidad de Fst regulan procesos del desarrollo, el metabolismo secundario, la reproducción y otros procesos del mantenimiento de la célula. Muchos de ellos son activados en una condición específica para regular la serie de genes requeridos. Las proteínas WC son capaces de unirse transitoriamente a promotores de genes de respuesta a luz en regiones denominadas LRE (Light Responsive Elements), y regular su expresión en *N. crassa* (Ballario et al. 1996; He et al. 2002). Recientemente se reportó que además, es capaz de unirse a regiones intergénicas y dentro del marco de lectura (Smith et al. 2010). Dando lugar a una oleada de transcripción en respuesta a la luz, que por consiguiente activa la expresión de reguladores globales que transmitan la señal de la luz.

Con el fin de determinar los genes dependientes del complejo WCC en *N. crassa* se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la proteína WC2 en respuesta a un pulso de luz. Se encontraron 22 Fst dependientes de WC-2 en respuesta a luz (Smith et al. 2010). De los 22 Fst, sólo los Fst *sah1*, *vad-3*,

*csp-1*, *NCU03643.2* y *sub-1* han sido estudiados mediante microarreglos en respuesta a luz. De ellos, sólo la mutante  $\Delta sub-1$  mostró una grave alteración en la respuesta transcripcional, que resultó en la inhibición de la expresión de genes de respuesta tardía y de algunos de respuesta temprana. Sin embargo se pueden observar ligeras alteraciones en el perfil transcripcional en respuesta a luz en las mutantes de los otros Fst estudiados (Chen et al. 2009). Esto nos indica que la respuesta transcripcional a luz en *N. crassa* se encuentra jerarquizada.

#### **2.4.0 Factores de transcripción de respuesta a luz encontrados en *T. atroviride***

Existen pocos reportes en *Trichoderma* sobre Fst en respuesta a luz, los más estudiados son los BLRs, que también actúan como receptores de luz. Sólo el gen *blu7* ha sido reportado como responsivo a luz y es dependiente de las proteínas BLR, además su función es aún desconocida. Recientemente se han encontrado algunos Fst inducidos por un pulso de luz en *T. atroviride* [(García-Esquivel et al. 2016)Tabla 1].

El FT tipo dedos de zinc clase I, CRE-1 se encarga de la represión de catabólica, y reprime la producción de las celulasas y xilanasas en *T. reesei* (Ilmén et al. 1997; Nakari-Setälä et al. 2009). En *Aspergillus*, el metabolismo de la fuente de carbono regulado por CreA mostró ser una complicada red de regulación tanto en glucosa como en etanol (Mogensen et al. 2006). En *Acremonium chrysogenum* CRE-1 regula la expresión de *pcbC* y *cefEF*, que codifican enzimas que intervienen en la biosíntesis de cefalosporina, en presencia de glucosa (Jekosch y Kück 2000). En *T. atroviride*, el gen *cre-1* se encontró inducido después de un pulso de luz,

sugiriendo que podría jugar un papel importante en el uso de una fuente de energía primaria (García-Esquivel et al. 2016).

**Tabla 1.** Factores de transcripción regulados por luz después de 30 minutos de un pulso de luz (García-Esquivel et al., 2016).

Gen	Dominio de unión a ADN (posición en la proteína)	Función	Relación de cambio (de 454)
<b>Inducidos</b>			
<i>cre-1</i>	ZnF_C2H2 (60-82, 88-112)	Represión catabólica por carbono	1.9
<i>nmrA</i>	NADB Rossman Fold	Represión de la asimilación de nitrógeno	3.5
<i>ace-1</i>	ZnF_C2H2 (396-420, 424-452, 459-484)	Regulador negativo de la producción de celulasas	2.9
<i>ace-2</i>	Zn(II)2Cys6 (1-47)	Regulador positivo de la producción de celulasas	15.1
<i>sah-1</i>	ZnF_C2H2(245-269, 275-299, 305-327, 333-358)	Alargamiento de hifas aéreas	3.7
<i>sah-3</i>	Zn(II)2Cys6 (31-76)	Alargamiento de hifas aéreas	1.9
<i>cp2</i>	CP2 family	Desarrollo en <i>Drosophila</i>	2.9
<i>blu7</i>	ZnF_C2H2(176-207)	No caracterizado	16.3
<i>cóblu</i>	Zn(II)2Cys6 (5-49)	No caracterizado	5.2
<i>rfeG</i>	No caracterizado	No caracterizado	1.7
<b>Reprimidos</b>			
<i>hac-1</i>	Basic Region Zipper	Leucin Respuesta a proteínas no estructuradas	0.4
<i>cóblu</i>	Zn(II)2Cys6	No caracterizado	0.2
<i>chblu</i>	ZnF_C2H2	No caracterizado	0.5

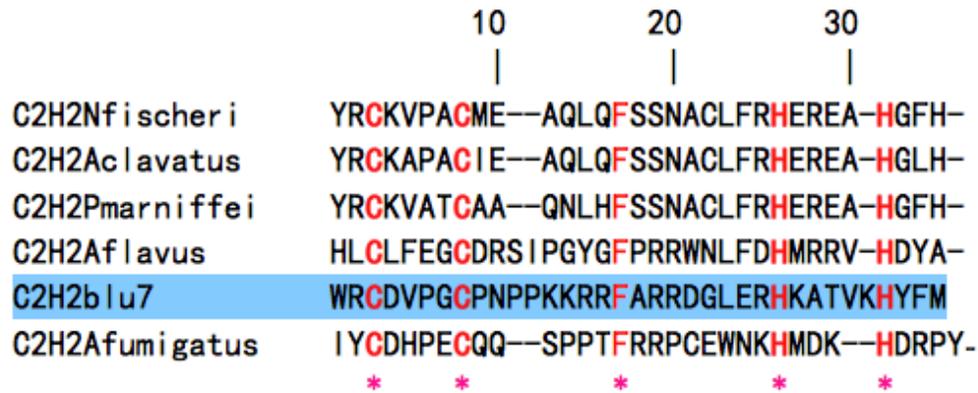
Por otro lado la represión metabólica del nitrógeno es realizada por el FT NmrA en *A. nidulans* (Andrianopoulos et al. 1998), a través de la represión de *areA* (FT dedo de Zinc, GATA), que activa la expresión de genes del catabolismo del nitrógeno (Kudla et al. 1990). En *T. atroviride* el gen *nmr-1*, ortólogo a *nmrA*, es inducido por un pulso de luz (García-Esquivel et al. 2016) y su función aún no ha sido determinada.

En *T. reesei* la producción de celulasas es inducida por la luz y reguladas a nivel transcripcional por ACE-1 y ACE-2 (Saloheimo et al. 2000; Aro et al. 2001; Schmoll et al. 2005). Los genes *blu7*, *c6blu*, *chbld* y *c6bld* codifican FsT que contienen dominios de unión a ADN tipo dedos de Zinc. Sin embargo, no cuentan con homólogos de proteínas de función conocida y únicamente tienen similitud con proteínas hipotéticas en la región del dominio unión a ADN (Fig. 2). El FT CP2 contiene un dominio de unión a ADN descrito en *Drosophila*, que está relacionado con el desarrollo de la fase embrionaria temprana y la organización correcta del sistema nervioso central (Dymlacht et al. 1989). La expresión de *cp2* por el estímulo de luz ha sido reportada en *A. nidulans* (Ruger-Herreros et al. 2011) y *N. crassa* (Chen et al. 2009) y recientemente en *T. atroviride* (García-Esquivel et al. 2016). En *N. crassa*, mutantes de *cp2* mostraron defectos en la separación de las conidias, el cual fue asociado a alteraciones en la pared celular (Paré et al. 2012).

La mayoría de estos FT aún no han sido descrito en hongos, por lo que resulta interesante conocer como intervienen en la respuesta a luz en *T. atroviride*. Por ello con el fin de esclarecer la regulación transcripcional en respuesta a luz de *T. atroviride*, se propone estudiar las respuestas tempranas a luz mediadas por FsT dependientes de los BLR's encontrados 30 minutos después de un pulso de luz. Como un primer acercamiento se escogieron los genes que *blu7* y *C6blu* que codifican FsT con dominios de

unión a ADN tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y Zn(2)Cys(6) respectivamente y se obtuvieron mutantes nulos de los genes. Se pretende obtener las mutantes de los FT *cp2*, *sah1* y *sah3*, que también son inducidos por luz y dependientes de los BLR. Los otros FT *rfeg*, *nmrA* y *cre1* no se tomaron en cuenta debido a que *cre1* y *nmrA* ya tienen una función conocida. En tanto que *rfeg* muestra homología con un FT de levaduras, que aún no se ha caracterizado su unión al ADN. En conjunto la caracterización de las mutantes de los FT nos permitirá la selección de un FT que se encuentre más relacionado con la respuesta de la fotoconidiación de *T. atroviride*.

El gen *blu7* se observó inducido de forma dependiente de los BLR y fue identificado como un factor de transcripción con un dominio de dedos de zinc tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en *T. atroviride* [Fig. 3; (Rosales-Saavedra et al. 2006)]. A continuación, presentamos el análisis de RNA-seq de mutantes por reemplazo génico en el gen *blu7* en respuesta a un pulso de luz azul para evaluar su papel en la fotoconidiación. La expresión rápida de *blu7* nos llevó a la hipótesis de que puede actuar en la segunda cascada transcripcional para inducir la reproducción asexual. Por otro lado, la reproducción asexual inducida por la carencia de glucosa y dependiente de la BLRC nos dirigió para evaluar la respuesta de las mutantes en presencia de luz constante con glucosa como única fuente de carbono.



**Figura 3. Alineamiento del dominio de unión a ADN de Blu7.** Alineamiento del dominio de unión a ADN tipo dedo de Zinc clase I de BLU7 con otras proteínas hipotéticas (ver abajo) con similitud significativa de acuerdo al BLASTp contra la base de datos del NCBI. Se puede observar la presencia de las cisteínas y de la histidinas que forman el dedo de zinc conservado, de acuerdo al patrón Cys-X2-4-Cys-X12-His-X3-5-His. C2H2Nfischeri, *Neosartorya fischeri*; C2H2Aclavatus, *Aspergillus clavatus*; C2H2Pmarniffei; *Penicillium marniffei*; C2H2Aflavus, *Aspergillus flavus*; C2H2blu7xx0, *Trichoderma atroviride*; C2H2Afumigatus, *Aspergillus fumigatus*.

### **3.0.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVO DE TRABAJO**

#### **3.1.0 Hipótesis**

La inducción de la expresión de genes por la luz es iniciada por las proteínas BLR, las cuales perciben la señal y promueven la expresión de FT que a su vez prosiguen con una cascada transcripcional a través del tiempo para lograr los cambios morfológicos que dan lugar a la conidiación en *T. atroviride*. Por lo que los factores de transcripción de inducción temprana por luz dependientes de las proteínas BLR establecen las condiciones necesarias para la fotomorfogénesis.

#### **3.2.0 Objetivo general**

Estudiar el rol del factor de transcripción Blu7 y C6blu dependiente de las proteínas BLR durante el proceso de esporulación de *Trichoderma atroviride* por el estímulo de la luz.

#### **3.3.0 Objetivos específicos**

1. Evaluar la participación de Blu7 en la fotoconidiación por un pulso de luz y en luz constante de *T. atroviride*
2. Evaluar la participación del probable factor de transcripción C6blu en respuesta a la luz.
3. Analizar la respuesta transcripcional de la mutantes en el gen blu7 en respuesta a un pulso de luz y luz constante

## **4.0.0 MATERIALES Y METODOS**

### **4.1.0 Material orgánico y medio de cultivo**

El hongo filamentoso *T. atroviride* fue usado como organismo modelo de la reproducción asexual en respuesta a luz azul. La cepa parental IMI206040 fue utilizada para obtener mutantes de los genes *blu7*, *c6blu* que codifican para factores de transcripción. Además incluimos a *sub1*, el cual se ha observado en regulación de genes de respuesta a luz en *N. crassa*, a pesar que no se reportado expresión dependiente de luz en *Trichoderma*. El crecimiento de rutina de las cepas fue realizado en medio de cultivo PDA, inoculando esporas frescas en el centro de la placa de Petri. Posteriormente se incubaron a 27 °C por 5 días en luz blanca constante de  $3.2 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  con el fin de obtener conidias frescas para posteriores tratamientos o por 36 h en oscuridad para los estímulos con luz azul. Para los ensayos de luz blanca constante se utilizó medio mínimo (MM) con  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.1 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.7 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.25 mM,  $\text{FeSO}_4$  13.1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  7  $\mu\text{M}$  and  $\text{MnCl}_2$  7.9  $\mu\text{M}$ , y glucosa al 2 %, usando 1.5 % de Bacto Agar de DIFCO para dar solidez al medio de cultivo.

### **4.2.0 Obtención de mutantes por reemplazo génico de los genes *blu7*, *c6blu* y *sub1*.**

Las mutantes de los genes *blu7*, *c6blu* y *sub1* fueron obtenidos por reemplazo génico del locus genómico correspondiente por el cassette *hph* que contiene al gen que codifica para la higromicina fosfotransferasa de 1.4 Kb, que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Mach et al. 1994). El fragmento genético de reemplazo fue construido de acuerdo a la técnica de PCR-doble unión (Yu et al. 2004). Se amplificó 1.4 Kb de la región 5' o 3' UTR (Untranslated región: región no traducida) partiendo de 200 pb rio arriba o rio debajo del inicio de la región codificante del gen

correspondiente y se unió al cassette de *hph* de 1.4 Kb por medio de oligonucleótidos solapantes (Tabla 2) a cada región (5'UTR-*hph*-3'UTR) para construir un fragmento final de 4.2 Kb después de tres rondas de PCR.

Para introducir el fragmento genético de 4.2 Kb se realizó un choque térmico a protoplastos de conidias frescas (Penttilä et al. 1987) de la cepa silvestre IMI206040 de *T. atroviride*. Las transformantes obtenidas fueron purificadas por medio de tres rondas de pases mono-espóricos, el cual consistió de esporas frescas espatuladas sobre medio con higromicina y tritón al 0-05% que posteriormente de 2 días se aisló una colonia a la cual se cultivó nuevamente a medio fresco con higromicina para obtener esporas frescas para reiniciar el proceso. La selección de cada colonia aislada se realizó al azar, el cual al final de las tres rondas de PCR se validó la introducción del cassette de *hph* por medio de PCR que amplifican selectivamente el fragmento genético de 4.2 Kb o el cassette de *hph* y parte de la región UTR del gen correspondiente.

Tanto la selección como la comprobación del reemplazo de las mutantes  $\Delta c6blu$  y  $\Delta sub1$  fueron realizadas por el Dr. Esquivel en su estancia en el Laboratorio de Expresión Génica y Desarrollo de Hongos.

#### **4.3.0 Manipulación de ARN y ADN**

Para la obtención de ARN o ADN genómico, se utilizó micelio colectado en nitrógeno líquido y conservado a -80 °C. Posteriormente para su extracción se pulverizó finamente en un mortero y se dosificó en tubos eppendorf añadiendo 0.4 g a cada uno. Con el fin de validar la integración del cassette de *hph* se extrajo ADN genómico (Reader y Broda 1985) de la cepa silvestre IMI206040 y de 6 transformantes del reemplazo de *blu7*, 6 para el gen *sub1* y 4 para el gen *c6blu*. Como primera aproximación, se amplificó el cassette de *hph* junto con 1.4 Kb de la región 3'UTR del gen correspondiente, utilizando los oligonucleótidos que sirvieron para obtener

el fragmento genético de 4.2 Kb en ADN genómico de la cepa silvestre (CS) y de cada una de las cepas transformantes. Posteriormente, se realizó la confirmación del reemplazo genómico por medio de un análisis tipo Southern blot.

Para obtener el cADN del gen *blu7* reportado por Rosales et al. (2006) se extrajo ARN total de muestras cultivadas tanto en luz como en oscuridad. Se utilizó la técnica de TRIZOL para la obtención del ARN total de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Así mismo, las muestras utilizadas para la extracción de ARN para secuenciación masiva por ILLUMINA fueron colectadas en nitrógeno líquido y pulverizadas antes de su extracción.

#### **4.3.1 Validación de las mutantes por Southern blot**

Para el análisis tipo Southern blot (Sambrook, J; Frisch 1989) se usaron 20 µg de ADN genómico de las transformantes  $\Delta blu7$ -1, -8, -9, -17,-23 y de la cepa silvestre que fueron digeridos con la enzima de restricción *Xho* I. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nylon, AMERSHAN, por capilaridad y se fijó el ADN digerido con ayuda de luz UV de un entrecruzador. La amplificación por PCR de 1.4 Kb de la región 3' UTR sirvió como sonda para indicar la integración del cassette de *hph*. La sonda marcada con  $P^{32}$  (dCTP $^{32}$ ) radiactivo fue añadida en contacto con la membrana de nylon para obtener la huella de los ADN digeridos. Seguidamente, la señal de la sonda marcada fue captada por medio de un película fotográfica KODAK exponiéndola a -80 °C por 2 días. El tratamiento de las transformantes de *cóblu* y *sub1* fue similar, excepto que la sonda de *cóblu* fue 1.2 kb de la región codificante y la enzima utilizada fue *BamH* I; en tanto que para *sub1* la sonda fue la región 5' del gen, y la enzima fue *Sal* I.

#### **4.3.2 Análisis de la expresión de *blu7* por PCR-semicuantitativo**

La expresión de *blu7* después de un pulso de luz y en luz constante fue determinado por PCR semi-cuantitativo. Cultivos de 48 horas en oscuridad, sobre cajas de Petri con PDA de la cepa mutante o de la cepa silvestre, fueron utilizados como inóculos para los ensayos de un pulso de luz azul. Los inóculos fueron incubados a 27 °C por 36 h en oscuridad, antes del impacto de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul, posteriormente se re-incubaron en oscuridad por 30, 45, 60 o 120 min. EL control de oscuridad fue tomado en los mismos tiempos. Después se procedió a la colecta del micelio en cada tiempo y la extracción de ARN total. Se diseñaron oligonucleótidos hacia el último intrón del *blu7*, de tal manera que el oligonucleótido 3' sea complementario solo al cADN. Así mismo, se analizó la expresión de *sah1* y *env1* después del pulso de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul. Los oligonucleótidos utilizados y el amplicón esperado se muestran en la tabla 2.

El ARN total fue tratado con DNase III de Invitrogen para eliminar cualquier residuo de ADN. Para la obtención del cADN se utilizó el protocolo de INVITROGEN para la enzima SuperScript™ II Reverse Retrotranscriptase, usando oligonucleótidos reversos dirigidos hacia el gen de interés (Tabla 2). Los tamaños de los amplicones para cada gen fue diseñado flanqueando un intrón del gen para discernir entre contaminación por ADN genómico de la síntesis reversa del cADN.

#### **4.4.0 Caracterización fenotípica de las mutantes en respuesta a luz**

Esporas de la cepa silvestre IMI206040 y la cepa mutante  $\Delta\text{blu7}$ ,  $\Delta\text{c6blu}$  o  $\Delta\text{sub1}$  fueron cultivados en medio PDA para obtener micelio crecido en oscuridad que sirviera como inóculo para los experimentos realizados con luz. Se inoculó PDA con bloques de agar, cortado con un sacabocados, de cajas de Petri de PDA con micelio de la CS o la mutante. Después de 36 h a 27 ° C se aplicó el estímulo de luz con la ayuda de una cámara de diodos que permite modular la intensidad de la luz. Así mismo, la cámara

de diodos sirvió como incubadora para los ensayos de luz azul constante de 4.9, 10 y 3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

#### **4.4.1 Estimulación de la conidiación por pulsos de luz azul**

Cultivos de 36 h a 27 °C en oscuridad de la CS o cepa mutante  $\Delta\text{blu7}$  o  $\Delta\text{c6blu}$  fueron estimulados para reproducción asexual. Se utilizó una cámara de diodos capaz de emitir luz azul con una fluencia de 30, 50, 80, 100, 250, 500, 900 y 1200  $\mu\text{molm}^{-2}$ . Posteriormente fueron incubados nuevamente en oscuridad por 36 horas. Al término de las 36 h las colonias fueron fotografiadas y el anillo de conidiación fue colectado con 8 ml de agua estéril para su cuantificación. Haciendo uso de un hematocimétero se contabilizó el número de conidias por cada caja de Petri de tres réplicas biológicas de cada cepa por cada una de las fluencias probadas.

El micelio utilizado para la secuenciación masiva por ILLUMINA partió de tres inóculos diferentes cultivados previamente en la oscuridad. Con la ayuda de un sacabocados de 0.5 cm se cortaron secciones de micelio de la parte más joven de la colonia de cada una de las cepas y se pasaron a placas de PDA nuevas, seguidamente se incubaron por 36 h a 27 °C en la oscuridad. Posteriormente, el pulso de luz azul de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  fue impactado sobre las colonias de la CS o de  $\Delta\text{blu7}$ , acto seguido se incubaron por 30 min en la oscuridad y el micelio fue colectado con nitrógeno líquido

#### **4.4.2 Cultivo de las mutantes en luz constante**

Para evaluar el efecto de la luz sobre el crecimiento de la cepa mutante comparado con la cepa parental, las cepas se cultivaron en luz blanca y luz azul constante por 72 h. Así como también por fotoperiodos de luz azul y oscuridad. Para evaluar la respuesta de la cepa  $\Delta\text{blu7}$  comparado con la CS en luz blanca constante de 3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , se cortaron 0.5 cm de agar con micelio de 48 h previamente cultivados en oscuridad. Acto seguido se

inocularon en el centro cajas de Petri de PDA de los cortes anteriores y se incubaron a 28 °C por 72 h, tomando mediciones del crecimiento radial cada 12 horas; al final de las 72 h se colectaron las conidias con 10 ml de agua estéril para su posterior cuantificación con un hematocitómetro.

La cepa mutante  $\Delta blu7$  y la CS fueron cultivadas en medio mínimo (MM) con glucosa, glicerol, fructosa o manitol como única fuente de carbono en luz blanca de forma similar a la descrita anteriormente, se utilizó cajas de Petri con PDA como control. Para el análisis transcripcional se cultivaron cepas mutantes de  $blu7$  y la CS sobre MM con glucosa al 2% por 60 h en luz constante, usando como control de oscuridad cultivos cubiertos con papel aluminio.

#### **4.5.0 Análisis transcripcional de la mutantes $\Delta blu7$ en presencia de luz azul**

La respuesta transcripcional después de 30 min de un pulso de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul sobre la cepa mutante y la CS resultó en 12 bibliotecas totales. Las bibliotecas fueron agrupados por condición de luz (3) y oscuridad (3) para cada cepa (2). Se tomaron tres replicas por cada condición, por lo que el experimento brindó validez estadística. Las lecturas fueron mapeadas al genoma de *T. atroviride* V2, publicado en por JGI (V2), por medio de Bowtie 2 (Langmead et al. 2009; Langmead et al. 2011) usando los parámetros por defecto de las opciones "very-sensitive". Posteriormente se cuantificaron las lecturas únicas para cada gen. La normalización de los genes expresados se realizó con EDGE-R (Robinson et al. 2012), tomando en cuenta aquellos genes con más de 6 lecturas en 2 o más bibliotecas. Posteriormente se obtuvieron los genes diferenciales de respuesta a luz tomando como control a sus respectivas cepas creciendo en la oscuridad. El punto de corte para ser considerado como gen diferencial fue un valor mayor de 1 o -1 del logaritmo base 2 del cambio de luz/oscuridad, con

una probabilidad menor de 0.01. La anotación funcional de los genes diferenciales fue realizado por medio de BLAST2GO y FUNCAT, utilizando un E-value  $> 1 \times 10^{-3}$  (Conesa et al. 2005; Conesa y Götz 2008).

La determinación de los genes diferenciales después de 60 h de luz blanca constante fue realizado de forma similar al pulso de luz azul. Las bibliotecas obtenidas fueron 12 en total, repartidas por triplicado en cada condición (Luz u oscuridad) por cada cepa (*Δblu7* o WT). Así mismo las lecturas fueron mapeados con Bowtie 2 al genoma de *T. atroviride* y cuantificados por medio de scripts de Linux. La obtención de los genes diferenciales fue con el mismo punto de corte así como la anotación funcional de los mismos con BLAST2GO y FUNCAT.

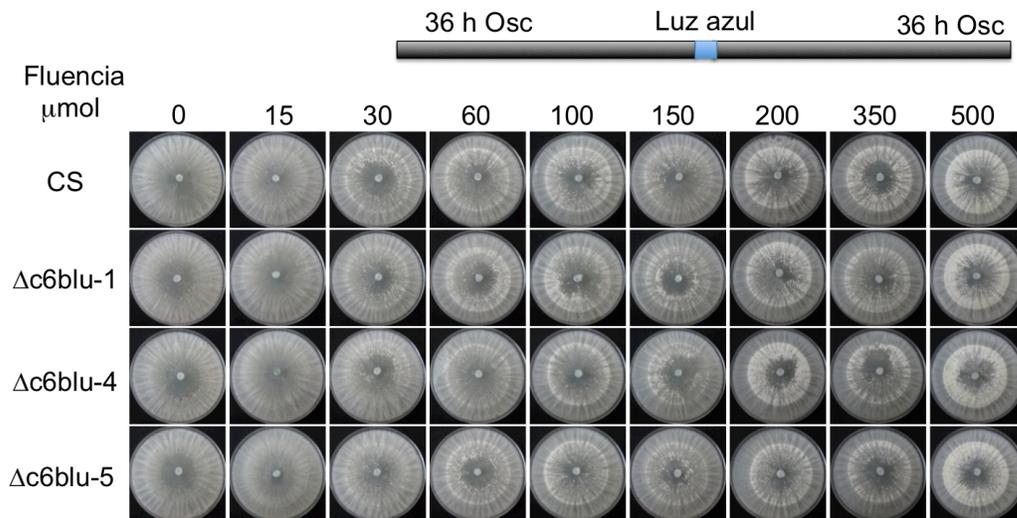
#### **4.6.0 Anotación funcional de los genes diferenciales**

La anotación funcional por “Gene Ontology” fue realizado con BLAST2GO con los parámetros por defecto reportado por (Götz et al. 2008) (Götz, 2008). Se obtuvo la anotación de los 11863 genes del genoma de *T. atroviride*, el cual fue usado como molde para los análisis de enriquecimiento, de los tratamientos del pulso de luz azul o luz blanca constante, de términos GO con los valores por defecto de BLAST2GO.

## 5.0.0 RESULTADOS

### 5.1.0 Caracterización fenotípica en respuesta a luz de la mutante $\Delta c6blu$

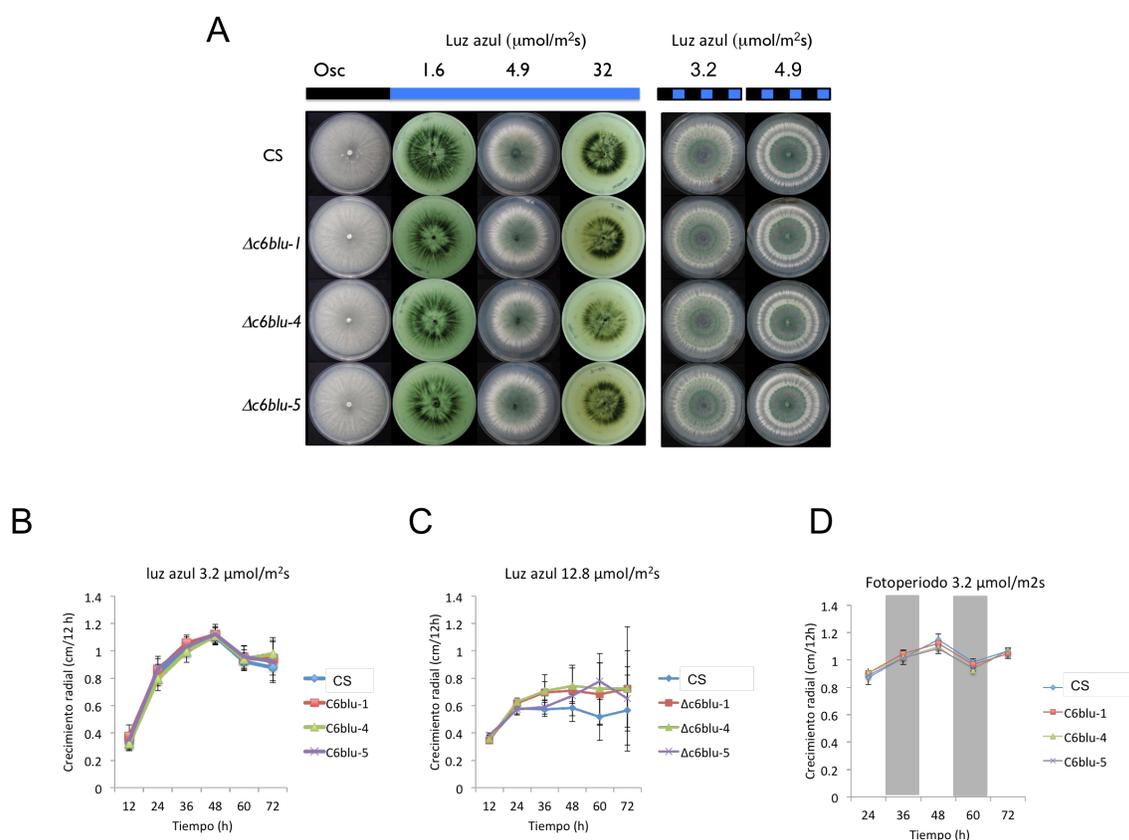
La selección y comprobación de las mutantes de *c6blu* fueron realizadas por Esquivel-Naranjo (Datos no publicados). Dado que la proteína *C6blu* contiene un dominio de dedos de zinc tipo  $Zn_2Cys_6$  y ser dependiente de las proteínas BLR, se procedió a evaluar el efecto de la luz azul sobre las mutantes en este gen. Para evaluar la formación del anillo de conidiación por un pulso de luz azul, se cultivaron por 36 h en oscuridad previo al impacto de la luz azul de 15, 30, 60, 100, 150, 200, 350 y 500  $\mu\text{molm}^{-2}$  (Figura 4).



**Figura 4.** Efecto de varias cantidades de luz azul sobre la mutante  $\Delta c6blu$ . Cultivos de 36 h en MM o PDA fueron impactados por 15, 30, 60, 100, 150, 200, 350 y 500  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul sobre las mutantes  $\Delta c6blu-1$ , -4, 5 y CS; tomando como control cultivos crecidos en la oscuridad.

Posteriormente se cultivaron nuevamente en oscuridad por 36 h, para luego ser fotografiadas. Las mutantes  $\Delta c6blu-1$ , -4 y -5 formaron el anillo de conidiación de forma similar como la cepa silvestre en todas las fluencias probadas, sugiriendo que la reproducción asexual no fue afectada por la ausencia del gen  $c6blu$ .

Por otro lado también se evaluó el efecto de la luz constante y el fotoperiodo sobre las mutantes  $\Delta c6blu$ . El cultivo de las mutantes  $\Delta c6blu$  en luz azul constante de 1.6, 4.9 y 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  mostró un fenotipo similar al observado en la cepa silvestre (Figura 5A). De igual manera, el fenotipo de conidiación por el fotoperiodo de cada 12 h de luz azul de 3.2 o 4.9  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fue similar a la cepa silvestre (Figura 5A).



**Figura 5.** Respuesta de las mutantes  $\Delta c6blu$  a luz azul constante y al fotoperiodo de 12 h luz-osc. A) Fenotipo de 3 mutantes independientes  $\Delta c6blu$  ( $\Delta c6blu-1$ ,  $\Delta c6blu-4$ ,  $\Delta c6blu-5$ ) y

CS (cepa silvestre) cultivadas por 72 h en luz azul constante de 1.6, 4.9 y 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , tomando como control cultivos en la oscuridad de cada cepa correspondiente. Así mismo, las cepas mutantes y silvestre fueron cultivada en fotoperiodos de 12 h de luz azul (3.2, 4.9  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y 12 h de oscuridad durante 72 h. B) Crecimiento radial de las mutantes independientes  $\Delta c6blu$  (1,4,5) y CS cada 12 horas en luz constante de 3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , C) 12.8  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y D) fotoperiodo de 12 h de luz azul (3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y 12 h de oscuridad

El crecimiento radial de las mutantes  $\Delta c6blu$  bajo luz azul constante de 3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  se mantuvo al mismo ritmo que la cepa silvestre (Fig. 5B), en tanto que a 12.8  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  la cepa silvestre mostró una pequeña disminución del crecimiento radial después de 36, sin embargo no fue significativo estadísticamente (Fig. 5C). Por otro lado el crecimiento radial de las mutantes  $\Delta c6blu$  fue similar a la CS en el fotoperiodo de 3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Fig. 5D).

Aunque la validación de la mutantes  $\Delta c6blu$  por Southern blot no se presentan en este documento, la selección de las mutantes fue realizado tomando únicamente cepas con resistencia al antibiótico higromicina. La caracterización de las transformantes obtenidas fue realizada después de tres pases monospóricos de cada cepa.

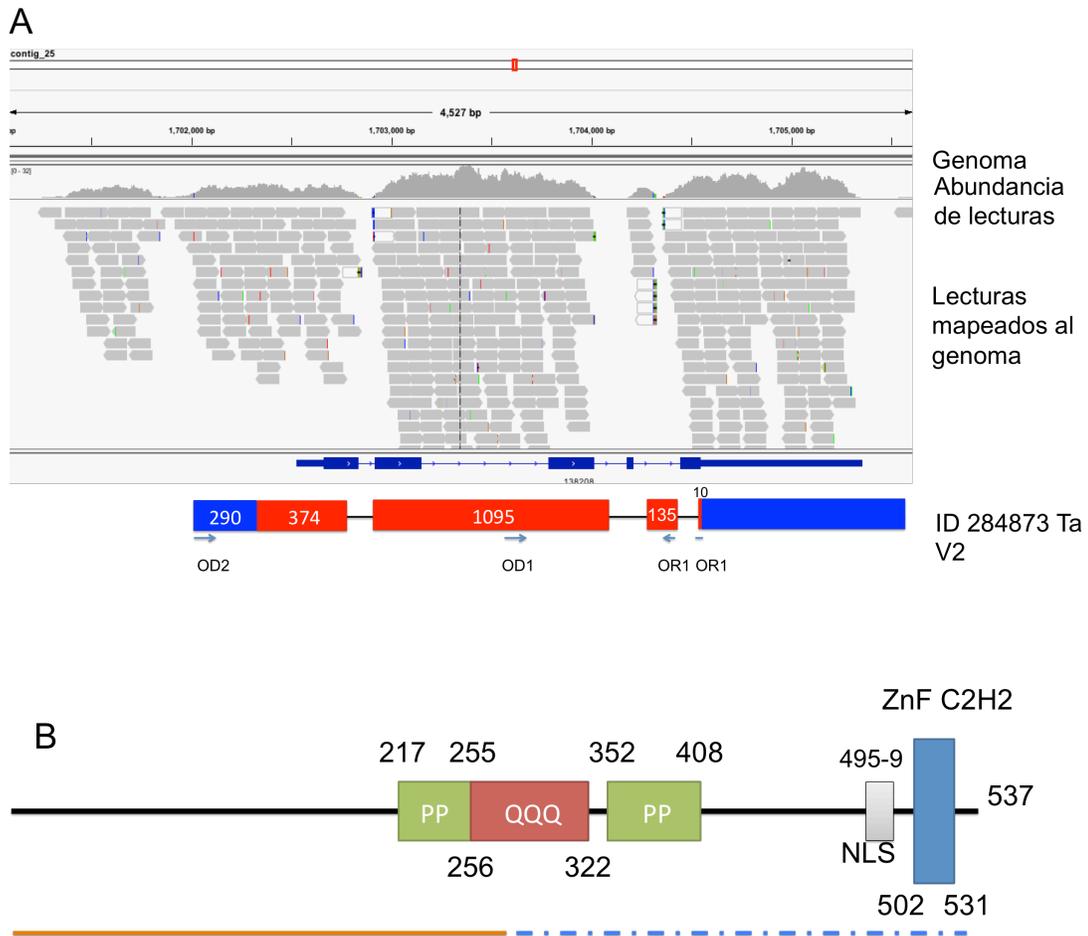
### **5.2.0 El gen *blu7* codifica para una proteína con dedos de zinc tipo C2H2 conservado en hongos filamentosos**

La secuencia codificante del gen *blu7* reportada por Rosales et al. (2006) da a lugar a una proteína de 213 aminoácidos. Esta secuencia contiene tres dominios: un motivo de localización mitocondrial en la región N-terminal, en la sección central de la proteína contiene una región rica en prolina y en la región C-terminal muestra el dominio de dedos de zinc tipo C2H2 junto con una señal de localización nuclear. Dada su expresión

temprana, dependiente del BLRC, y su posible función como factor de transcripción, hipotetizamos que interviene en la regulación de genes que dan lugar a la conidiación en respuesta a luz. Por lo que obtuvimos una mutante de reemplazo génico así como su respuesta transcripcional en presencia de luz azul y blanca.

Inesperadamente, las lecturas obtenidas por secuenciación masiva, tanto por un pulso de luz como por luz constante, empalmaron con los exones predichos para el ID 284873, el cual tiene un marco de lectura diferente del ID 138208 reportado en el genoma de *T. atroviride* (Figura 6 A). Por lo que amplificamos el cADN completo de 3002 pb para este gen que resultó en la secuencia reportada en el GENBANK con ID KU666056. EL marco lectura de este cADN codifica para una proteína de 537 aminoácidos (Figura 6 B), el cual contiene 324 aminoácidos más en la región N-terminal que la reportada por Rosales et al, 2006.

El gen *blu7* (ID 284873) consta de 3 intrones (82, 163 y 57 pb) y 4 exones (474, 1095,135 y 10 pb), el marco de lectura contiene 1614 pb que codifica para una proteína de 537 aa (Figura 6B). De manera interesante, Blu7 solo fue encontrado en ascomicetos, ya que inclusive la región C-Terminal que contiene el dominio de C2H2 no fue encontrada en levaduras. No obstante, Blu7 mantuvo similitud con proteínas de función desconocida o proteínas predichas de hongos filamentosos.



**Figura 6.** Evidencia de la expresión del ID 284873 por secuenciación masiva. A) Lecturas mapeadas al genoma de *T. atroviride* en la región del locus con ID 138208, abajo se muestra el ORF del ID 284873. Las barras rojas muestran los exones, las líneas negras muestran los intrones y las barras azules las regiones UTR. B) Representación de la secuencia primaria del probable factor de transcripción Blu7. Los números indican la posición de los aminoácidos de los motivos encontrados, la líneas azules discontinuas marcan la proteína reportada por Rosales (azul) y la línea amarilla continua marca el inicio de la proteína de acuerdo a los datos de secuenciación.

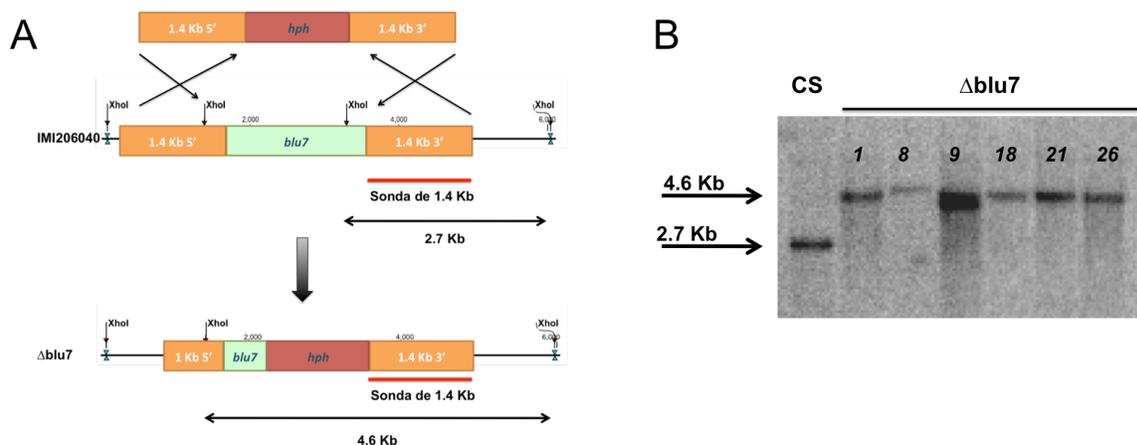
### 5.3.0 Validación de las mutantes por Southern blot

La selección de transformantes por reemplazo génico del locus de *c6blu* y *sub-1* por el cassette de resistencia *hph*, fueron realizados por medio de amplificación por PCR de las regiones flanqueantes del locus del gen en

cuestión. Así mismo, se usaron oligonucleótidos específicos para amplificar el cassette de resistencia junto a la región genómica correspondiente.

Para identificar la integración del cassette *hph* en las transformantes  $\Delta blu7$  de *T. atroviride*, se realizaron pruebas tipo PCR para amplificar el cassette de *hph*, así como de 1.4 Kb de la región 5' o 3' UTR del gen *blu7* por medio de los oligonucleótidos Pblu7-F y TBLU7-R (Tabla 2).

La confirmación del reemplazo del locus de 642 pb de *blu7* fue realizada mediante Southern blot. La sonda utilizada de 1.4 Kb de la región 3' UTR del gen *blu7* marcadas con  $\alpha$ -dCTP<sup>32</sup> permitió la identificación de la señal de 4.7 Kb en las transformantes de *blu7* y de 2.7 Kb para la CS, debido a la pérdida del sitio *Xho* I en la cepa mutante (Figura 7).



**Figura 7.** Análisis tipo Southern blot de las mutantes  $\Delta blu7$ . A) Representación esquemática del fragmento del cassette de *hph* unido a 1.4 Kb de la región 5'UTR y 3'UTR del gen *blu7* usado para reemplazar el ORF (cuadro verde) del gen Silvestre. Se muestra una digestión in silico de 6 Kb del locus de *blu7* con *Xho* I. En el reemplazo de *blu7* por *hph* se perdió un sitio de restricción para *Xho* I. B) Radiografía de la digestión de ADN genómico con *Xho* I de 6 transformantes independientes de  $\Delta blu7$  y la CS. 1.4 Kb de la región 3'UTR fue marcada con  $\alpha$ -dCTP<sup>32</sup> y usado como sonda para detectar el fragmento de 2.7 Kb para la CS y 4.6 para las mutantes en *blu7*.

**Tabla 2.** Lista de oligonucleótidos utilizados para obtener las mutantes de *blu7* y *sub1* por PCR doble unión.

Blu7

Oligonucleótidos usados para el PCR Doble-unión

Nombre	Secuencia	Tamaño	Enzima
Pblu7-F	CTG CTG GTC CTT GCC TGT GAC C	22	
PQblu7-R	TGC TCC TTC AAT ATC AGT TAA CGT CGA TCA GTT GTT GCT GCG GCG GCG ATG C	52	
TQblu7-F	CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG TCT CTG TCA CCC GAA GTC ACG G	52	
Tblu7-R	CAC GAG CTC GTC AAC AGA ACG C	22	
N5'-BLU7-F	CTG CAC TAC CCA GCT GTC TC	20	
N3'-BLU7-R	CCA CCC GGC TCG CAG AC	17	
Oligonucleótidos para <i>hph</i>			
hph-F	GATCGACGTTAACTGATATTGAAGGAG	27	
hph-R	CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGG	30	

Oligonucleótidos para sobreexpresar *blu7*

ORFBLU7-F	GGA TCC AAG CAA TCA TGG CAT CAA CCC	27	BamHI
ORFBLU7-R	GAA TTC TTT TCT ATT GAT TGA GAC GAT GAG	30	EcoRI

Oligonucleótidos para PCR semicuantitativo

GPD-F	GCTGCCGATGGTGAGCTCAAGGG	23	
GPD-R	GAGGTCGAGGACACGGCGGGA	21	
qBlu7-F	ACCGTAACTCATCTTTTGC GC	21	
qBlu7-R	GTTTGCCTTATTCTTGCGCC	21	
ENV-F	AATGGTTCCTTCAGGGTCTTCA	22	
ENV-R	CACCTCCAACGTGACTGTCAG	21	
SAH1RT-5F	CACCGTGACATTCACCAACGAAC	23	
SAH1RT-3R	GCATTTGGTGCACTGGCTGCA	21	

Sub1

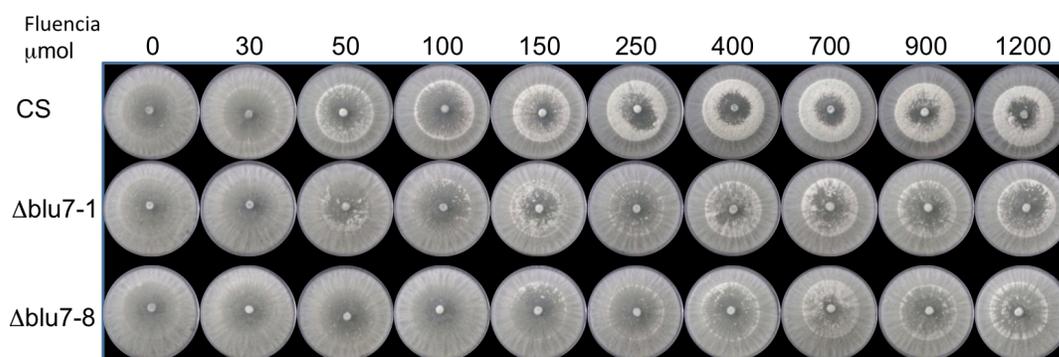
Psub1-F	CAT CGA AGC AGG GCT GGC TG	20	
PQsub1-R	TGC TCC TTC AAT ATC AGT TAA CGT CGA TCA CCT CTG TCG GGC TCC AAC G	49	
TQsub1-F	CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG TGA GGC GGT AGC ACC AAG AGG	51	
Tsub1-R	GAT AGG ACA AGG ACA GCC AAG G	22	
N5'-sub1-F	GTA CGA ACG CCA GTG ACG G	19	

N3'-sub1-R	GAA GCT GAA GAC CGT TGA AGC	21	
ORFsub1-F	GGA TCC AGC CTG TCA TGG CAG CAG C	25	BamHI
ORFsub1-R	GAA TTC TTG GTG CTA CCG CCT CAG C	25	EcoRI

#### 5.4.0 Caracterización fenotípica de mutantes en *blu7* en presencia de luz azul

##### 5.4.1 La fotoconidiación está disminuida en las mutantes $\Delta blu7$

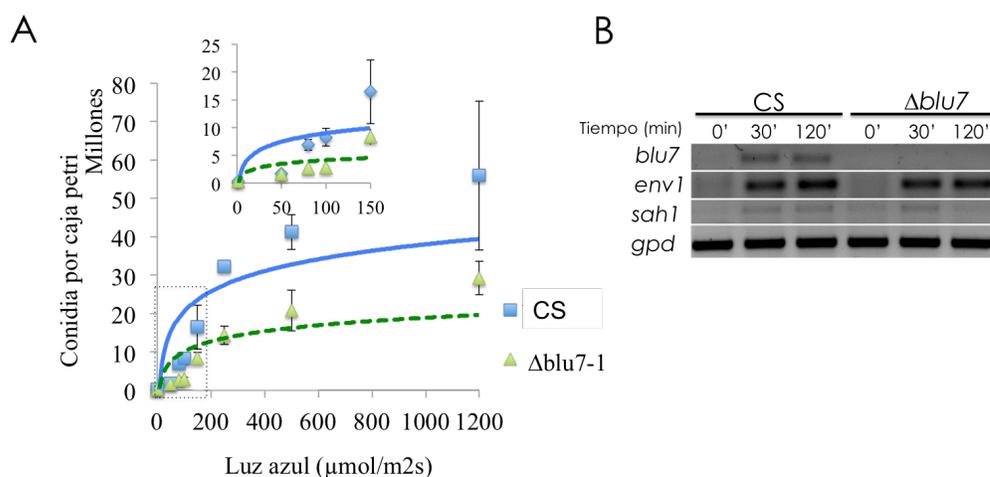
Dado que el gen *blu7* es dependiente de las proteínas BLR, se procedió a evaluar la respuesta a la fotoconidiación de las mutantes. La cuantificación de la conidiación se realizó después de un pulso de 30, 50, 80, 100, 150, 250, 500, 900 y 1200  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul. La formación del anillo de conidiación en la mutante *blu7* por un pulso de luz azul fue menos intenso comparado con la CS; a tal punto que la mutante requirió fluencias mayores de 150  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul para tener visible el anillo de conidiación, a diferencia de la CS que con 50  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul fue capaz formar esporas asexuales (Figura 8).



**Figura 8.** Experimento de dosis respuesta a la luz azul y formación del anillo de conidiación de la mutante  $\Delta blu7$  y la CS. La cepa silvestre y dos mutantes independientes de  $\Delta blu7$  fueron cultivadas en la oscuridad por 36 para ser expuestas a 30, 50, 100, 150, 250, 400, 700, 900 y 1200  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul, seguidamente fueron cultivadas por 36 h en la oscuridad para ser fotografiadas.

De manera interesante la curva dosis-respuesta de fotoconidiación de la mutante resultó en menor cantidad de producción de conidias en comparación de la CS, pero no de la cantidad de energía requerida para iniciar la respuesta (Figura 9A). Esto nos sugiere que la percepción de luz en la mutante no fue interrumpida sino mas bien la intensidad de la respuesta a conidiación. Por lo que la disminución de la conidiación se debe a la ausencia de *blu7* más que a un defecto en la percepción de la luz. Para confirmar esta hipótesis se evaluó la expresión por PCR-semicuantitativo del gen *env1*, dependiente del complejo fotorreceptor, y del gen *sah1*, además del gen *blu7*, y como control de carga al gen *gpd*, después de un pulso de luz azul de  $100 \mu\text{molm}^{-2}$  (Figura 9B).

La expresión de *blu7* en la cepa WT se mantuvo desde los 30 hasta los 120 minutos después del pulso de luz azul, en tanto que la mutante no mostró ninguna expresión en presencia de luz como se esperaba. La expresión de *env1* mostró niveles de expresión similares en la cepa WT y  $\Delta\text{blu7}$ , sugiriendo que la vía de los BLRC está intacta, ya que también el FT *sah-1* mostró el mismo comportamiento.



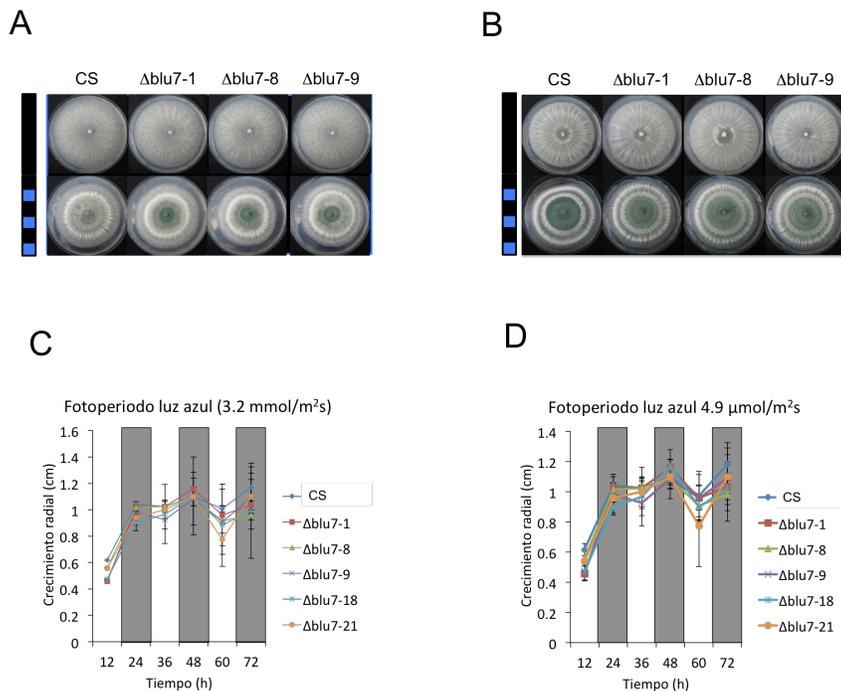
**Figura 9.** Fotoconidiación por un pulso de luz azul y expresión de genes dependientes de las BLR en las mutantes  $\Delta\text{blu7}$  y CS. A) Producción de conidias por un pulso de luz azul de

50, 80, 100, 150, 250, 500 y 1200  $\mu\text{molm}^{-2}$ . B) Análisis de expresión de *blu7*, *env1* y *sah1* por PCR semicuantitativo después de 30 y 120 min de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul. El gen *gpd* fue tomado como control interno.

### 5.4.2 Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de las mutantes $\Delta\text{blu7}$

La ausencia de las proteínas BLR resulta en la inhibición del crecimiento en presencia de luz azul o roja en *T. atroviride*, por lo que nos preguntamos si el probable factor de transcripción Blu7 está implicado en este proceso.

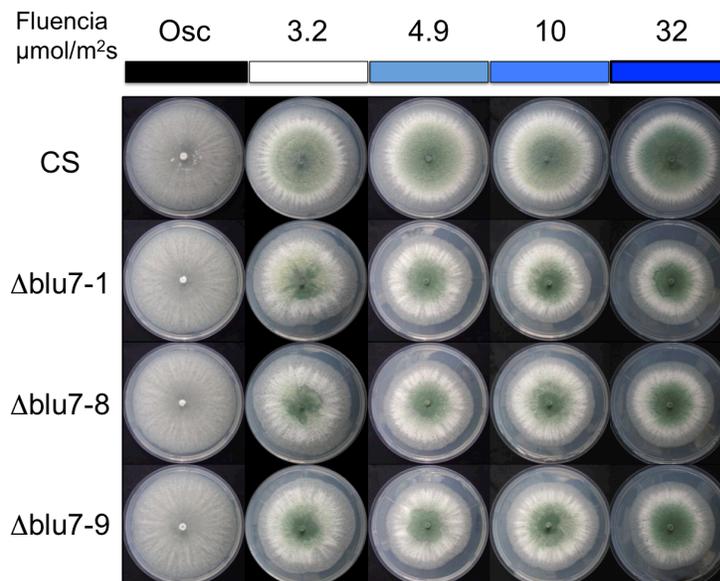
Procedimos a evaluar el crecimiento de las mutantes bajo fotoperiodo de 12 h luz-12 h oscuridad con 3.2 y 4.9  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 10A, B). La cepa silvestre formó el anillo de conidiación esperado por la exposición a luz, así mismo las 3 mutantes independientes de  $\Delta\text{blu7}$  respondieron como la CS. El crecimiento radial de la cepa silvestre fue menor cuando se expuso a luz que cuando se mantuvo en oscuridad, este mismo comportamiento fue observado con las cepas mutantes  $\Delta\text{blu7}$  (Figura 10C, D).



**Figura 10.** Efecto del fotoperiodo de 12 h luz-osc en mutantes  $\Delta blu7$  y CS sobre el crecimiento. Fenotipo A, B) y C, D) crecimiento radial cada 12 h de las mutantes  $\Delta blu7$ -1, -8, -9 y CS cultivados en fotoperiodo de A) 3.2 y B) 4.9  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

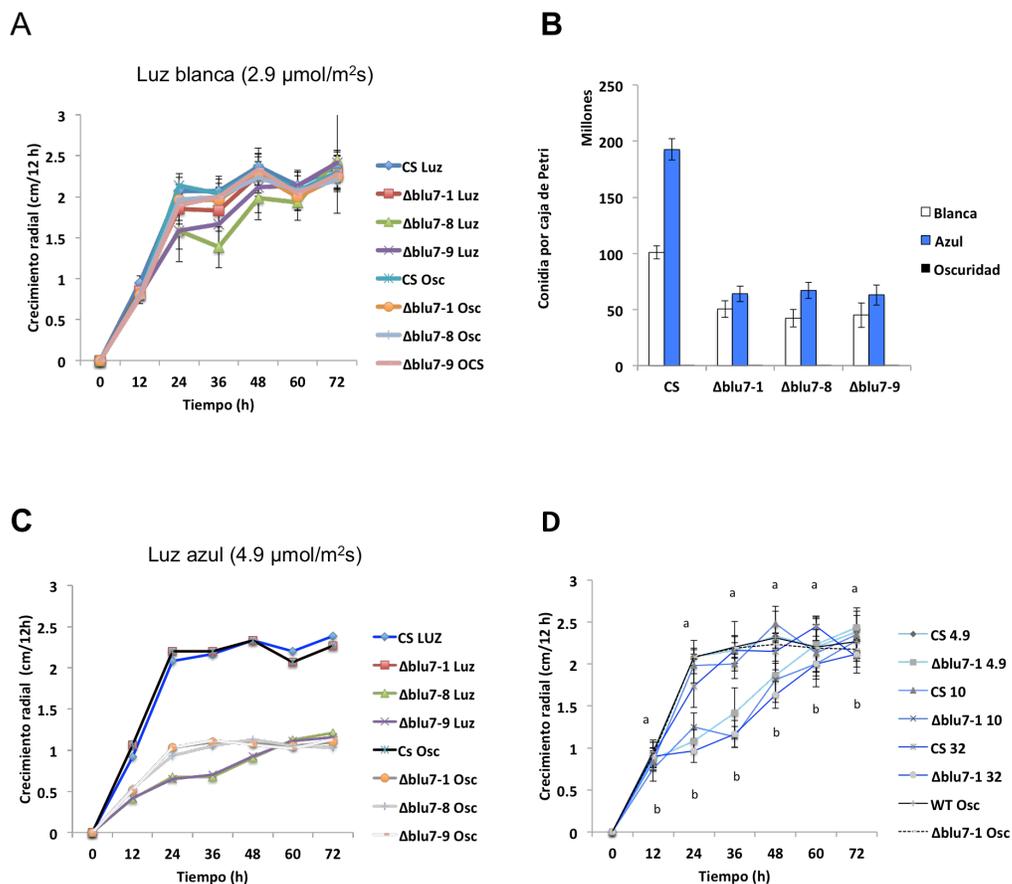
### 5.4.3 La luz constante reduce el crecimiento en las mutantes de $\Delta blu7$

Para evaluar el crecimiento de la mutante en presencia de iluminación constante se cultivaron en luz blanca de 3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  o azul de 4.9, 10 y 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 72 horas (Figura 11). El fenotipo en la oscuridad de las mutantes  $\Delta blu7$ -1, -8 o -9 fue el mismo que el de la CS. En presencia de luz blanca de 3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  se observó una alteración del crecimiento radial en las mutantes  $\Delta blu7$ , así como del área de conidiación en comparación con la CS. La presencia de luz azul sobre las mutantes  $\Delta blu7$  mostró una disminución en el diámetro de la colonia desde 4.9  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  que fue más evidente con 10 y 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 11).



**Figura 11.** Respuesta de las mutantes  $\Delta blu7$  y CS a iluminación constante con luz blanca de 3.2  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  o luz azul de 4.9, 10, y 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 72 h, tomando como control el comportamiento de las cepas en oscuridad

El crecimiento de la CS en luz blanca constante de  $2.9 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  fue el mismo que el de su control en oscuridad, en tanto que las mutantes  $\Delta\text{blu7}$  mostraron una pequeña disminución del crecimiento desde las 24 h que alcanzaron la velocidad de crecimiento de la CS hasta las 60 h (Figura 12A). Cuando se evaluó el efecto de la luz azul constante de  $4.9 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  sobre las mutantes  $\Delta\text{blu7-1}$ ,  $\Delta\text{blu7-8}$  o  $\Delta\text{blu7-9}$  se observó un retardo en el crecimiento radial comparado con su propia oscuridad, el cual no se presentó en la CS (Figura 12B). La producción de esporas asexuales de la CS en luz blanca fue 40 % menor que el presentado en luz azul. En las mutantes  $\Delta\text{blu7}$  la producción de conidias en luz azul fue similar al presentado en luz blanca (Fig. 12C). Lo que nos indica que Blu7 participa en la fotoconidiación por luz azul.



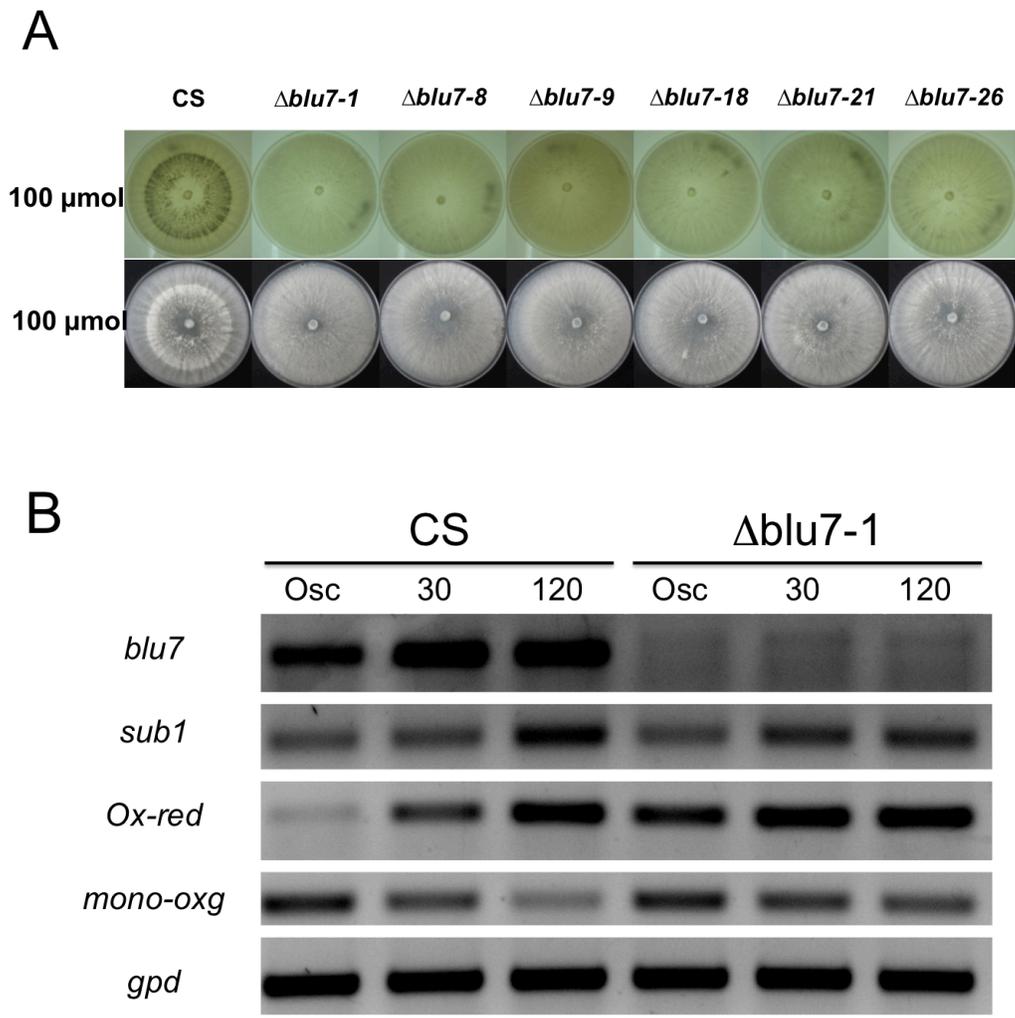
**Figura 12.** Curvas de crecimiento de mutantes  $\Delta blu7$  y CS en luz constante. A) Crecimiento radial de CS y mutantes  $\Delta blu7-1$ , -8 y -9 en luz blanca o C) luz azul constante. B) Cuantificación de la producción de conidias en luz blanca o luz azul constante de CS y mutantes  $\Delta blu7-1$ , -8 y -9. D) Crecimiento radial de la mutante  $\Delta blu7$  y CS a luz azul constante de 4.9, 10 y 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

El retardo en el crecimiento de la mutante  $\Delta blu7-1$  bajo luz azul constante de 4.9  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fue más pronunciado cuando se cultivaron a 10 y 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Mientras que en la CS el crecimiento radial no fue afectado por la luz azul constante significativamente (Figura 12D).

### **5.5.0 Respuesta transcripcional de la mutante $\Delta blu7$ por el estímulo de 100 $\mu\text{molm}^{-2}$ de luz azul**

La ausencia del gen *blu7* resultó en cepas mutantes incapaces de formar el anillo de conidiación con 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul (Figura 13A). Además, la expresión de genes marcadores de respuesta a luz como *env1*, *sah1* mostraron el mismo perfil de expresión por medio de PCR semicuantitativo a 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  en la mutante  $\Delta blu7-1$  y la CS (Fig. 13B), en tanto que la expresión de *sub1* y una *monooxigenasa* mostraron una pequeña represión e inducción a 120 min, respectivamente, en la  $\Delta blu7$  en comparación con la CS (Figura 13 B).

De manera interesante, una oxido-reductasa que es inducida por luz y reprimida en oscuridad en la CS, está inducida desde la oscuridad en la mutante  $\Delta blu7$  y se mantiene inducida en presencia de luz (Fig.13B). Dada la ausencia de esporas asexuales con 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul en las mutantes  $\Delta blu7$ , nos preguntamos si tal bloqueo en la conidiación era debida a falta de respuesta génica controlada por este probable factor de transcripción. Por lo que se realizó secuenciación masiva de micelio de la cepa mutante y la CS después de 30 min del pulso de luz azul de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$ .



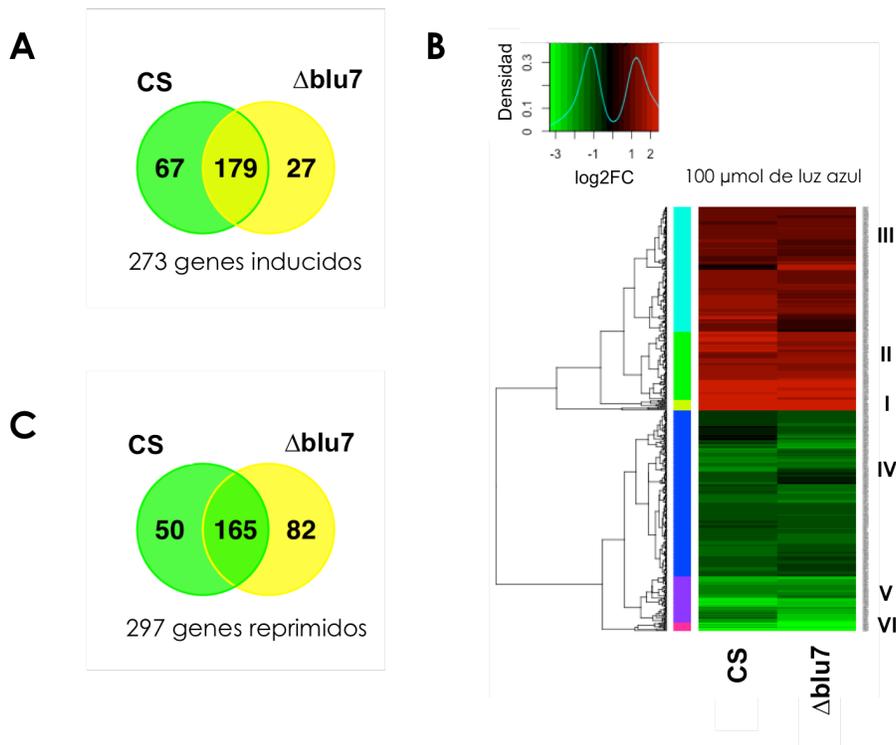
**Figura 13.** Respuesta de la mutante  $\Delta blu7$  y la CS después de un pulso de luz azul Ausencia del anillo de conidiación después de un pulso de luz azul de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  en mutantes  $\Delta blu7$  (A) y análisis de expresión de genes responsivos a luz en la mutante  $\Delta blu7-1$  a 30 y 120 min después del pulso de luz azul.

### **5.5.1 La ausencia de *blu7* resulta en la alteración de la expresión de genes responsivos a luz**

El estímulo de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul sobre la CS resultó en 461 genes diferenciales con respecto al control de oscuridad, en tanto que 453 genes diferenciales fueron encontrado en la cepa mutante  $\Delta blu7-1$ , respecto a su control en la oscuridad. Se encontraron 179 genes inducidos en ambas cepas, 67 genes inducidos exclusivos de la cepa silvestre y 27 genes inducidos presentes solo en la mutante (Figura 14A). Por otro lado se encontraron 165 genes reprimidos compartidos en ambas cepas, 50 genes reprimidos únicamente en la CS y 82 genes reprimidos exclusivos de la mutante (Figura 17C).

La agrupación jerárquica de los 570 genes diferenciales encontrado en ambas cepas dio lugar a 6 grupos principales (Figura 14B). Los genes inducidos fueron encontrados en los primeros tres grupos y los restantes relacionados a los genes reprimidos. En el grupo (cluster) III podemos observar genes claramente inducidos en la CS pero sin cambio en la mutante, así como genes reprimidos en el grupo IV que están sin cambio en la mutante o en la CS. La comparación de la respuesta transcripcional de la cepa mutante y la cepa silvestre en condiciones de oscuridad mostró un total de 11 genes tiene un cambio significativo en su expresión, sin embargo pertenecen a proteínas no caracterizadas.

La anotación funcional de los 570 genes diferenciales por cada cepa, realizado por BLAST2GO, mostró procesos biológicos similares en ambas cepas (Figura 15A). Sin embargo, se observan procesos del desarrollo y procesos de organismos multicelulares presentes solo en la CS regulados positivamente, en tanto que genes inducidos relacionados a señalización estuvieron presentes solo en  $\Delta blu7$ . Por otro lado, las categorías del proceso biológico en los genes reprimidos estuvieron presentes en ambas cepas, pero con más componentes en la cepa mutante.



**Figura 14.** Respuesta transcripcional de la mutante  $\Delta blu7-1$  y CS después de un pulso de luz azul de  $100 \mu\text{molm}^{-2}$ . Comparación de los genes inducidos (A) y reprimidos (BC) entre la cepa mutante  $\Delta blu7-1$  y la CS después de 30 min del pulso de luz. (C) Agrupación jerárquica de los 570 genes responsivos de la cepa mutante  $\Delta blu7-1$  y la CS.

De manera interesante, los genes inducidos compartidos mostraron una correlación mayor ( $R=0.83$ ) que los genes reprimidos ( $R=0.57$ ) compartidos, sugiriendo un rol importante de Blu7 en la regulación negativa de los genes reprimidos después del pulso de luz azul. Dentro de los genes inducidos presentes solo en la mutante, se encontraron 8 genes sin cambio en la CS (Figura 15B). En tanto que en el lado opuesto, encontramos 6 genes exclusivos inducidos en la CS que claramente no tuvieron cambio en la mutante (Figura 15B).

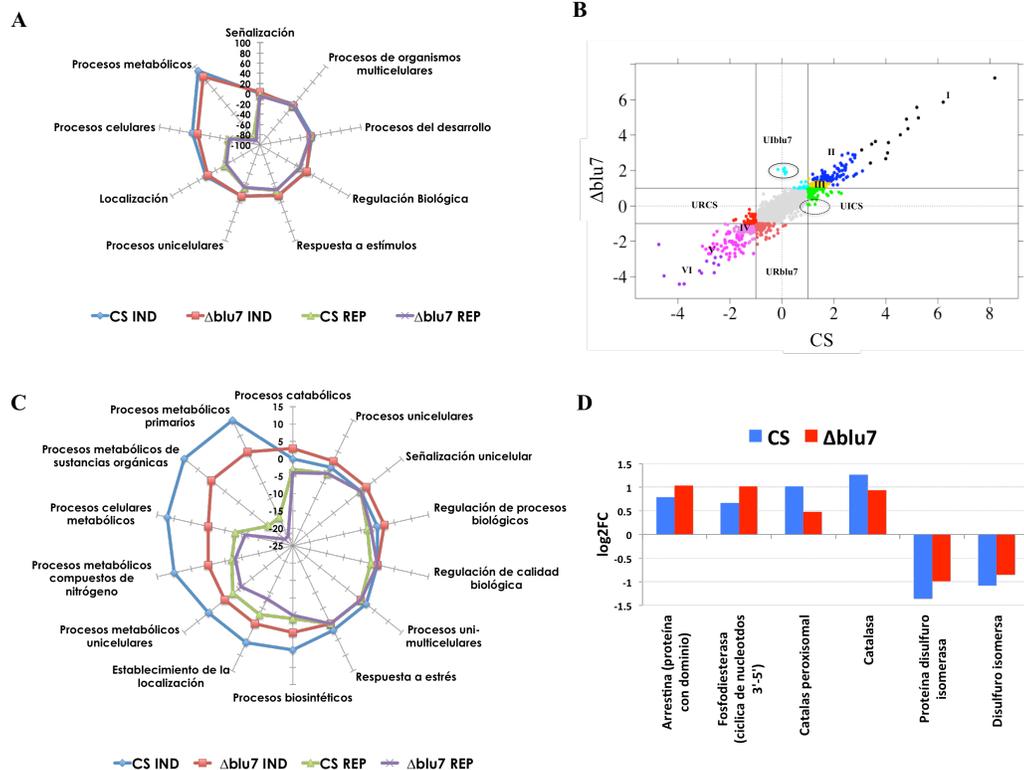
La anotación funcional por BLAST2GO de los genes exclusivos de cada cepa mostraron grandes diferencias en las categorías inducidas del

proceso biológico (Figura 15C). En la CS se encontraron inducidos procesos relacionados al estrés, compuestos del metabolismo del nitrógeno, el establecimiento de la localización, la biosíntesis y los procesos metabólicos que no se encontraron en la mutante. En cambio en la cepa mutante procesos relacionados a regulación biológica, regulación celular y procesos de señalización se encontraron inducidos pero no en la CS (Figura 15C). Los genes reprimidos exclusivos de cada cepa presentaron las mismas categorías, exceptuando procesos de calidad biológica que solo fue reprimido en la CS. En la figura 15 D se muestra el perfil de expresión de los genes de la categoría de señalización (*3'-5' nucleótido cíclico fosfodiesterase*, *proteína con dominio de arrestina*), estrés (*catalasa*, *catalasa peroxisomal*) y regulación de la calidad biológica (*proteína disulfito isomera*, *disulfito isomerasa*).

### **5.5.2 Las mutantes $\Delta blu7$ son severamente inhibidas en el crecimiento por luz en presencia de glucosa.**

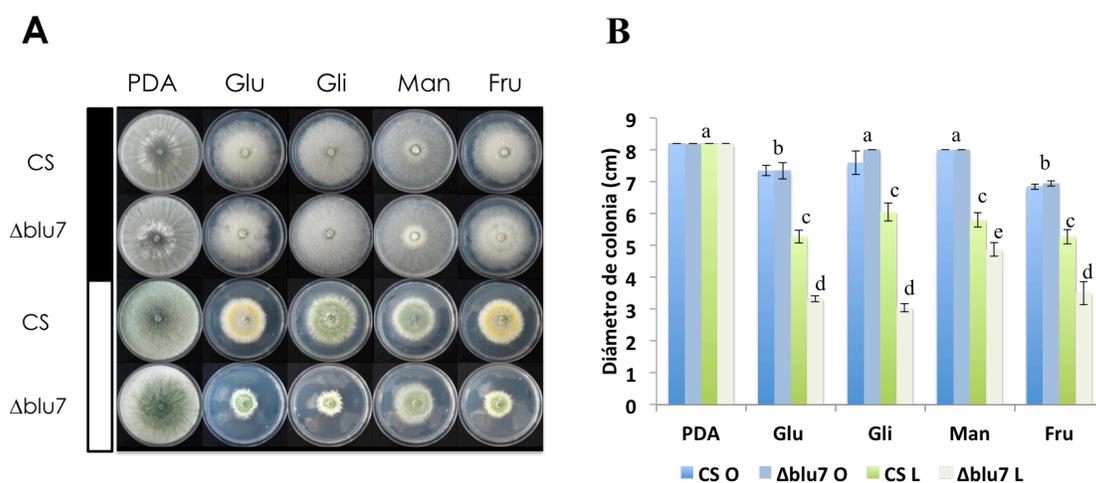
El cultivo de las mutantes  $\Delta blu7$  en luz azul constante mostró un retardo en la velocidad de crecimiento radial. En este sentido, reportes anteriores señalan que la fuente de carbono tiene una gran influencia tanto positiva como negativa sobre el crecimiento de un forma dependiente de BLR1 o BLR2 (Friedl et al. 2008b). Por ello, probamos 4 fuentes de carbono implicadas en el crecimiento en luz constante. Los cultivos correspondientes se mantuvieron bajo luz blanca constante de  $3.2 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , se inocularon sobre medio mínimo con 2 % de glucosa, glicerol, manitol o fructosa, además se utilizó PDA como control de crecimiento tanto en luz como en oscuridad (Figura 16). El fenotipo de la mutantes en PDA fue similar al de la CS tanto en luz como en oscuridad (Figura 16A). En tanto que en presencia de glucosa, glicerol o fructosa, el crecimiento radial se redujo significativamente, así como la pigmentación de las colonias. Por

otro lado en presencia de manitol el crecimiento radial se vio menos afectado, aunque la colonia se observó menos densa (Figura 16A)



**Figura 15.** Anotación funcional de los genes responsivos a  $100 \mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul en la mutante  $\Delta\text{blu7}$  y CS. A) Anotación de BLAST2GO por proceso biológico del total de genes diferenciales entre luz Vs oscuridad de la cepa  $\Delta\text{blu7}$  y CS. B) Grafica del  $\log_2\text{FC}$  de los genes responsivos de  $\Delta\text{blu7}$  vs CS, mostrando los genes inducidos y reprimidos en ambas cepas (Grupo I $\rightarrow$ VI), así como los genes únicamente inducidos o reprimidos en  $\Delta\text{blu7}$  (UIblu7, URblu7 respectivamente) o CS (UICS, URCS respectivamente). EL óvalo en UIblu7 señala los genes no responsivos en CS pero claramente inducidos en la mutante, en tanto que el óvalo en UICS señala los genes sin cambio en  $\Delta\text{blu7}$  pero claramente inducidos en la CS. C) Anotación funcional por proceso biológico de los genes únicamente inducidos o reprimidos en la mutante  $\Delta\text{blu7}$  o CS. D) Expresión de genes relacionados a la categoría de estrés and señalización de la anotación total de los genes.

El crecimiento en PDA fue similar en la cepa mutante  $\Delta$ blu7 y la CS tanto en luz como en oscuridad (Figura 16B). La diferencia más notoria fue observada cuando se cultivaron las cepas en MM con glucosa. En la CS se observó una disminución del crecimiento en luz constante comparado con su control en la oscuridad. En la mutante la disminución del crecimiento en glucosa fue 55 % con respecto a su control en la oscuridad y 37 % con respecto a la CS en luz. De forma similar, la disminución del crecimiento en glicerol fue 60 % y 49 % con respecto a su propia oscuridad o la CS en luz. Cuando se cultivaron en manitol el crecimiento de las mutantes fue similar tanto en luz como en oscuridad. Las mutantes mostraron un comportamiento similar en presencia de fructosa al observado al emplear glucosa (Figura 16B)



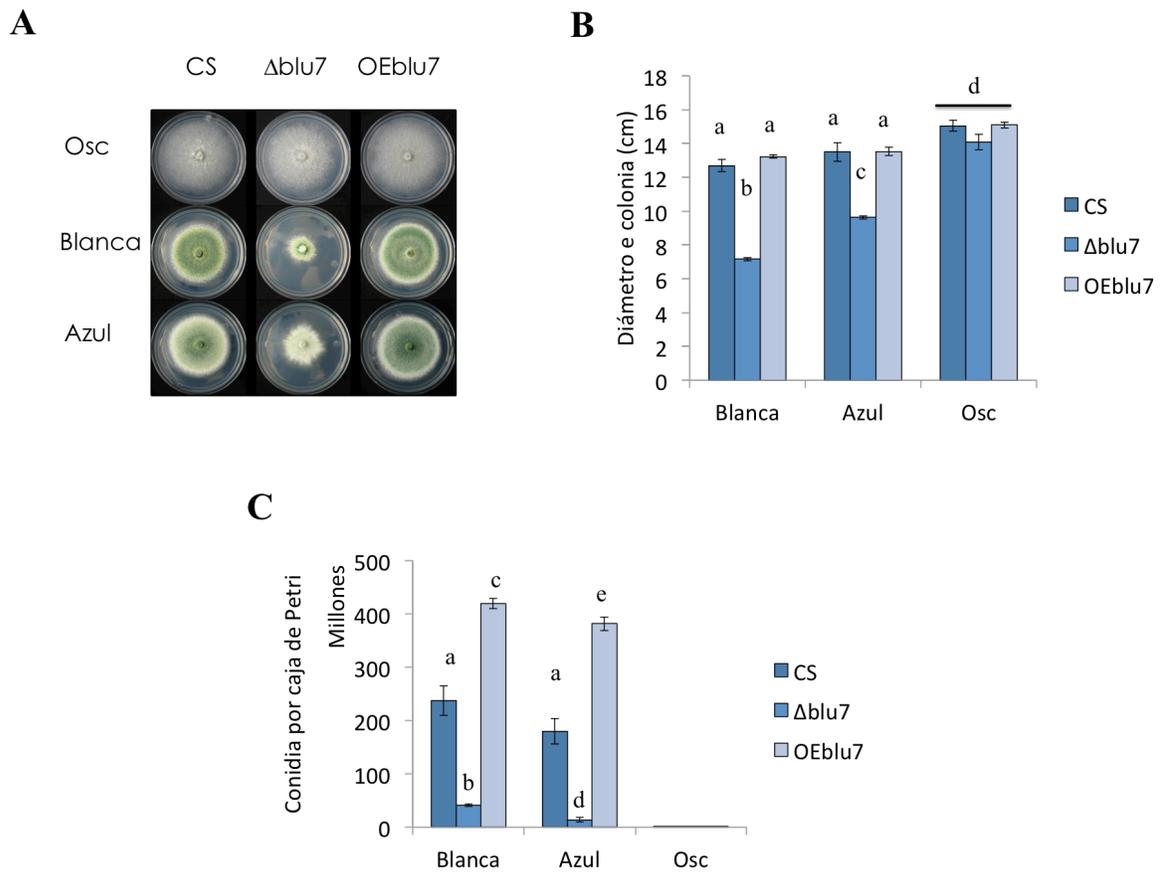
**Figura 16.** Efecto de la fuente de carbono sobre la mutante  $\Delta$ blu7 y CS en luz constante cultivado en medio mínimo con glucosa, glicerol, manitol o fructosa. A) Fenotipo y B) crecimiento radial de la CS y la cepa mutante  $\Delta$ blu7 después de 72 h de cultivo en luz blanca constante con PDA, glucosa (Glu), glicerol (Gli), manitol (Man) o fructosa (Fru) como fuente de carbono.

### **5.5.3 La sobreexpresión de *blu7* aumenta la tolerancia a la luz constante.**

Con el fin de exacerbar la función de Blu7, se obtuvieron transformantes sobreexpresantes del cADN de *blu7* reportado por Rosales et al (2006), bajo el promotor constitutivo de la piruvato cinasa de *T. reesei*. Se recuperaron 3 transformantes sobreexpresantes que mostraron la expresión del gen *blu7* tanto en luz como oscuridad. Las tres transformantes mantuvieron el mismo fenotipo en luz y en oscuridad, del cual mostramos la transformante OEblu7-9.

El cultivo de la cepa sobreexpresante de *blu7* (OEblu7) en medio mínimo con glucosa mostró un diámetro de colonia similar que la CS después de 72 h en luz (blanca o azul) constante, así como el control de oscuridad (Figura 17 A,B). Notoriamente, la cuantificación de las conidias presentes en toda la caja de Petri mostró una mayor producción en la cepa OEblu7 comparado con la CS (Figura 17C).

De manera interesante, la conidiación de OEblu7 en presencia de luz azul fue ligeramente menor que en luz blanca, pero 70 % mayor comparada con la de la CS. En tanto que la mutante  $\Delta blu7$  mostró apenas 17 % de la producción de conidias en luz blanca y 8 % en la luz azul comparado con la CS. De manera interesante, la sobreexpresión de *blu7* presentó un fenotipo similar a la CS tanto en PDA como en glucosa en oscuridad pero una mayor formación de conidias solo en presencia de luz, indicando una activación de Blu7 por luz o una interacción con proteínas presentes solo en luz.



**Figura 17.** Efecto de la luz blanca y luz azul constante en la mutante  $\Delta$ blu7, la sobreexpresante de blu7 (OEblu7) y CS cultivadas sobre glucosa como fuente de carbono. A) Fenotipo y B) crecimiento radial de las CS, mutante y sobreexpresante de blu7 después de 72 h en luz blanca, azul u oscuridad. C) Cuantificación de la producción de conidias de la cepa mutante  $\Delta$ blu7, sobreexpresante OEblu7 y CS en iluminación constante blanca o azul.

La formación de conidias en presencia de luz presenta una dependencia de la fuente de carbono en el medio de cultivo y por las proteínas BLR1 o BLR2. Así mismo, el crecimiento en luz constante se ve afectada por la ausencia de las proteínas BLR bajo ciertas fuentes de carbono. Como *blu7* es dependiente de los BLR, nos preguntamos cuales son los genes

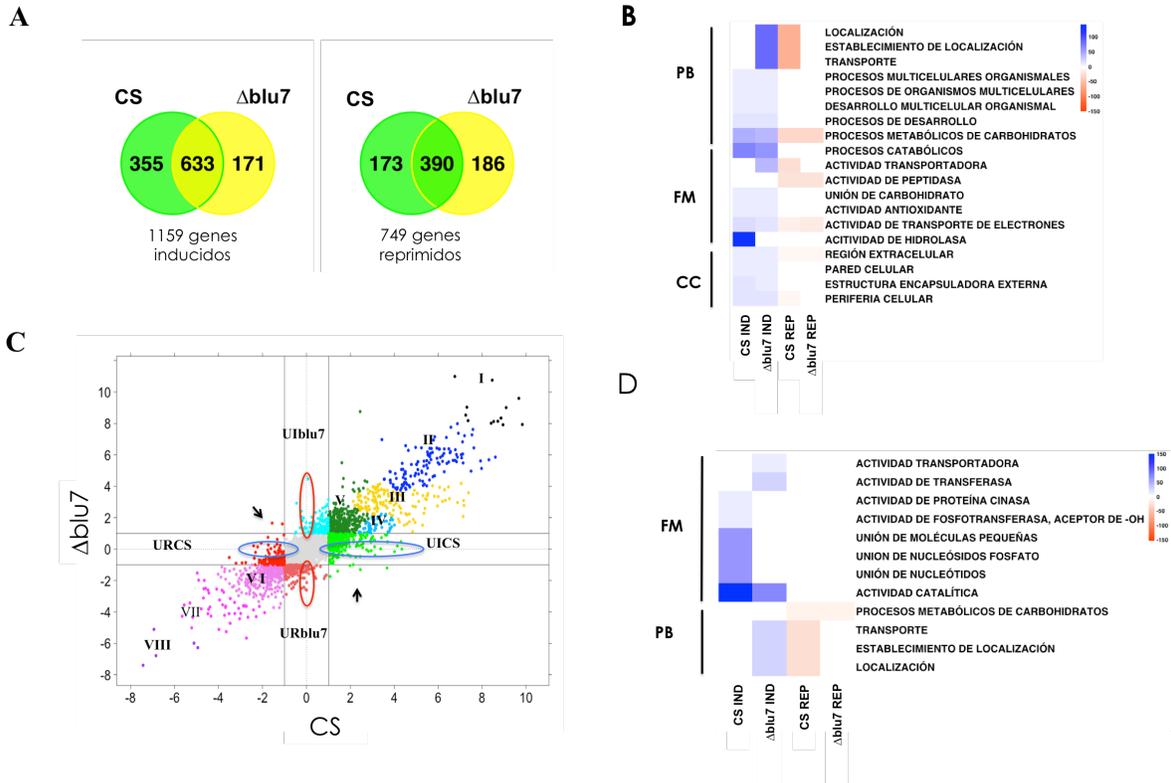
relacionados a la tolerancia a luz constante en presencia de glucosa, para ello se realizó un transcriptoma a 60 h de luz blanca constante con glucosa al 2% como única fuente de carbono.

#### **5.5.4 La principal respuesta a luz constante requiere movilización del nitrógeno para el crecimiento**

La exposición a la iluminación constante en presencia de glucosa estimuló un cambio en la expresión diferencial del 16 % (1901 de 11865) del total de los genes del genoma con respecto al control en la oscuridad. Un total de 1159 genes inducidos fueron encontrados en ambas cepas, de los cuales 633 genes se indujeron en ambas cepas, 355 solo se encontraron en la CS y 171 fueron encontrados únicamente en la mutante  $\Delta$ blu7. En el caso de los genes reprimidos, se obtuvieron 749 genes diferenciales totales, de los cuales 173 fueron reprimidos solo en la CS y 186 estuvieron presentes solo en la mutante  $\Delta$ blu7 (Figura 18A).

La anotación funcional del total de genes diferenciales de ambas cepas se realizó por BLAST2GO (Götz, 2008). Posteriormente, se realizó un análisis de enriquecimiento de los términos GO de todos genes inducidos y reprimidos de cada cepa por Proceso Biológico, Función Molecular y Componente Celular, usando un punto de corte de FDR <0.05. Los términos-GO de los genes inducidos de la cepa mutante y la cepa CS por proceso biológico mostraron las mismas categorías enriquecidas, exceptuando las categorías GO de localización, establecimiento de la localización y transporte de los genes inducidos de la cepa mutante, que en la CS fueron enriquecidos en las categorías reprimidos (Figura 18B). En las categorías de función molecular se observó que la actividad de transporte fue inducida en la mutante y reprimida en la CS, en tanto que el término-GO de actividad de hidrolasa fue enriquecido solamente en la categoría inducida de la CS. Las categorías inducidas o reprimidas de

Componente Celular fueron similares en la CS y mutante  $\Delta blu7$ , excepto la de periferia celular que fue reprimida solamente en la CS (Figura 18B).



**Figura 18.** Respuesta transcripcional de la mutante  $\Delta blu7$  y CS después de 60 h de luz blanca constante cultivados en glucosa como fuente de carbono. A) Total de los genes diferenciales inducidos o reprimidos de la mutante  $\Delta blu7$  y CS en respuesta a luz blanca constante. B) Categorías de GO enriquecidas de los genes inducidos y reprimidos en la mutante  $\Delta blu7$  y CS. C) Gráfica del  $\log_2 FC$  de los genes diferenciales de la cepa  $\Delta blu7$  vs CS, mostrando los grupos de genes inducidos y reprimidos encontrados en ambas cepas, así como los genes únicamente diferenciales en la cepa mutante  $\Delta blu7$  (Ulblu7, URblu7) o únicamente diferenciales en la CS (UICS, URCS). D) Categorías de GO enriquecidas de los genes únicamente diferenciales de la mutante  $\Delta blu7$  o de la CS. Los enriquecimientos fueron obtenidos tomando al menos 5 genes en cada categoría con  $FDR < 0.05$ .

La agrupación jerárquica de los genes diferenciales resultó en 8 grupos principales (Figura 18C). El comportamiento de los genes inducidos

compartidos entre  $\Delta$ blu7 y CS (Grupos I-III) mostraron una mayor inducción en los genes de la CS; en tanto que los genes reprimidos compartidos (Grupos VI-VIII) entre  $\Delta$ blu7 y CS, se observó un nivel mayor de represión en la mutante (Figura 18C).

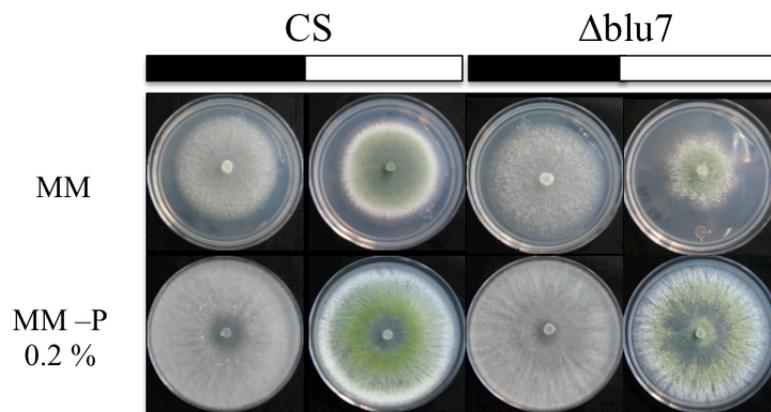
El número de genes inducidos exclusivos (355) de la CS (UICS) fue el doble que los genes inducidos exclusivos (171) en la mutante (UIblu7). Además, observamos que 48 genes se indujeron en la CS pero sin cambio en la mutante, en tanto solo 18 genes mostraron un comportamiento contrario en la mutante  $\Delta$ blu7. También logramos observar genes inducidos en la CS que en la cepa mutante fueron reprimidos, así como el comportamiento contrario para genes de la cepa mutante (Figura 18C, flechas). El número de genes reprimidos exclusivos de la CS fue menor que los de la cepa mutante, 3 de esos genes mostraron ser inducidos en la mutante. De igual manera se encontraron 7 genes reprimidos en la cepa mutante que mostraron ser inducidos en la CS. Interesantemente, las categorías del proceso biológico localización, establecimiento de la localización y transporte fueron enriquecidas en los genes responsivos exclusivos inducidos de la mutantes y en los mismos términos GO, reprimidos en la CS. En cambio las categorías GO enriquecidas por función molecular estuvieron presentes solo en los genes inducidos de la mutante o la CS. La cepa silvestre presentó 5 categorías de función molecular (Unión nucleotídica, unión nucleósido fosfato, unión de pequeñas moléculas, actividad de fosfotransferasa y actividad de proteína cinasa) ausentes en la mutante, por el contrario la mutante presentó 2 categorías de función molecular (actividad de transferasa y actividad transportadora) ausente en la CS (Figura 18D).

### **5.5.5 La regulación del crecimiento en presencia de luz es dependiente de la disponibilidad de nitrógeno.**

Los términos GO de proceso biológico: Localización, Establecimiento de la localización y Transporte fueron enriquecidos en los genes reprimidos de la CS, por el contrario las mismas categorías fueron enriquecidos en los genes inducidos de la cepa mutante. La anotación funcional de los genes asociados a estos procesos se encontraron relacionados al metabolismo y movilización del nitrógeno. También, se observaron categorías inducidas únicamente en la CS (Unión a nucleótidos, unión a nucleósido-fosfato, unión a pequeñas moléculas, actividad de fosfotransferasa, actividad de proteína cinasa), así como categorías únicamente inducidas en la cepa mutante (Actividad de transferasa y Actividad de transporte). El término GO de actividad metabólica de carbohidratos fue la única categoría enriquecida en los genes reprimidos de ambas cepas.

Los genes reprimidos relacionados a la movilización el nitrógeno en la CS fueron relacionados a Transportadores generales MFS (Major Facilitator Superfamily), transportadores de monosacáridos o generales de azúcares MFS, permeasas generales de aminoácidos y permeasas de metionina principalmente. En tanto que en la mutante, los genes inducidos relacionados a transporte fueron MFS de transporte de drogas, péptidos, aflatoxinas, azúcares, permeasas de allantoato, permeasas de aminoácidos, transportadores de pantotenato y permeasas de purinas y prolina. El hecho de presentar categorías de transporte reprimidas en la CS pero inducidas en la mutante que en su mayoría fueron relacionadas a la movilización del nitrógeno, nos llevó a hipotetizar que el metabolismo del nitrógeno interno pudiera ser la principal causa del crecimiento reducido en presencia de luz, ya que la regulación positiva de movilización de nitrógeno de almacenamiento, como el allantoato, sugiere una percepción de nitrógeno limitado por la cepas mutantes. Por ello

añadimos al medio mínimo una fuente de nitrógeno rica en aminoácidos y péptidos como la peptona para subsanar la probable deficiencia (Figura 19).



**Figura 19.** Efecto de la adición de peptona al 0.2 % en el medio mínimo sobre la cepa mutante  $\Delta blu7$  y CS en presencia de luz constante u oscuridad.

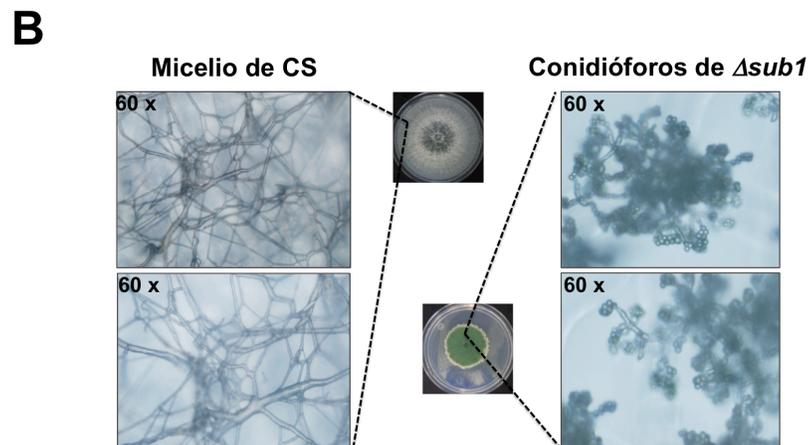
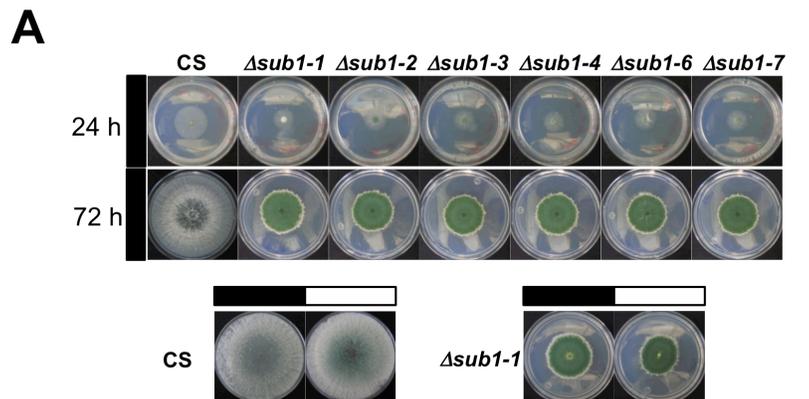
El crecimiento radial de la cepa mutante  $\Delta blu7$  fue comparable con el de la cepa silvestre al término de 72 h de cultivo en medio mínimo suplementado con peptona al 0.2 % en presencia de luz blanca constante así como con el control en la oscuridad (Figura 22). Sin embargo, es de hacer notar que la formación de esporas asexuales (visto como coloración verde de la colonia) fue menor que el control silvestre.

### **5.6.0 Regulación negativa de la conidiación por *sub-1*, un posible interactor genético de *blu7***

El homólogo del factor de transcripción con dedos de zinc tipo GATA, SUB-1, dependiente de WCC en *N. crassa* (Chen et al., 2009), mostró mayor inducción en la cepa mutante  $\Delta blu7$  en comparación con la CS en respuesta a un pulso de luz azul (Anexo 1). En *N. crassa* SUB-1 regula

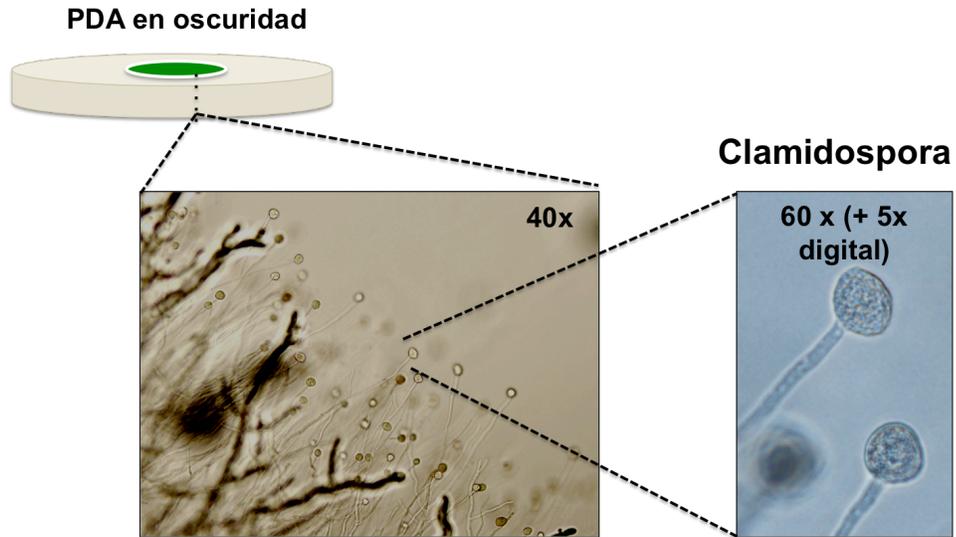
positivamente genes de la respuesta tardía por un pulso de luz; sin embargo, su ausencia no mostró ninguna alteración de la reproducción asexual, sino más bien una alteración en la reproducción sexual, al permitir la formación de protoperitecios sumergidos en medio líquido (Colot et al., 2006).

En cambio, en *T. atroviride* la mutante, de reemplazo génico, de *sub-1* mostró un fenotipo de sobre-esporulación asexual ya sea en luz constante o en la oscuridad (Figura 20A), sugiriendo un rol negativo en la reproducción asexual. Además, los conidióforos formados por la mutante  $\Delta sub1$  en oscuridad fueron extensamente ramificados y con varios conidios por ramificación, en comparación con la CS que solo mostró micelio agregado bajo oscuridad (Figura 20B).



**Figura 20.** Fenotipo de las mutantes  $\Delta sub-1$  en presencia de luz u oscuridad. A) Mutantes independientes de *sub-1* ( $\Delta sub-1$  1-7) fueron cultivadas sobre PDA y fotografiadas después de 24 o 72 h en oscuridad (Panel superior, barras negras). Cultivo de CS y mutante  $\Delta sub1$  sobre PDA en presencia de luz (barras blancas) u oscuridad (barras negras)(Panel inferior). B) Fenotipo del micelio de la cepa silvestre en oscuridad bajo el microscopio invertido a 60 x (panel izquierdo) comparado con el conidióforo de la cepa mutante  $\Delta sub1$  formado en la oscuridad.

Sorpresivamente al observar el micelio vegetativo de la cepa mutante  $\Delta sub-1$  después de 72 h de crecimiento en oscuridad, se notaron clamidosporas sumergidas en el medio de cultivo a 40 X (Figura 21), las cuales no han sido reportadas en la cepa silvestre en cultivos con una fuente rica de nutrientes como el PDA. Las clamidosporas son estructuras asexuales resistentes en la especie de *Trichoderma* que son formadas bajo condiciones de estrés de nutrientes (Li et al. 2005; Simkovič et al. 2008). Estos datos apuntan a que SUB1 de *T. atroviride*, actúa como un regulador negativo de la reproducción asexual. Por lo que un incremento de expresión de *sub1* por el pulso de luz en las mutantes  $\Delta blu7$  podría bloquear la conidiación a bajas fluencias.



**Figura 21.** Clamidosporas de mutante  $\Delta_{sub1}$  después de 72 h de cultivo sobre PDA en oscuridad. Sección transversal del medio de cultivo visto bajo el microscopio invertido a 60 x del micelio vegetativo de  $\Delta_{sub1}$  y clamidosporas sumergidos en el medio de cultivo.

## 6.0.0 DISCUSIÓN

### 6.1.0 Modulación de la conidiación por Blu7 a bajas fluencias de luz azul

Con el cADN de *blu7* reportado por Rosales et al. (2006), se obtuvieron transformantes anti-sentido que mostraron conidiación reducida después de un pulso de luz azul (Esquivel-Naranjo 2007). Por lo anterior, se obtuvo una mutante por reemplazo génico para la región de 642 pb correspondiente al cADN de *blu7*, tomando 120 pares adicionales río arriba y río abajo del marco de lectura reportado por Rosales et al. (2006).

A pesar que la interrupción de *blu7* no fue completa, la región reemplazada abarcó la sección central de la proteína que contiene el motivo rico en glutamina y prolina, además de la región C terminal que contiene la señal de localización nuclear y el dominio de unión a ADN. Por esta razón, esperábamos que la interrupción parcial del gen truncara la función de la proteína como factor de transcripción.

La formación del anillo de conidiación, característico de *T. atroviride*, por un pulso de luz en la mutante  $\Delta blu7$  requirió fluencias mayores que en la CS. Dado que con  $100 \mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul la CS fue capaz de producir esporas asexuales visibles pero no la mutante, decidimos comparar el cambio poblacional de los transcritos en ambas cepas en la oscuridad y después de 30 min del pulso de luz con el fin de determinar aquellos genes que son regulados en la CS pero no en la mutante con posible función en la reproducción asexual.

Mediante secuenciación masiva de Illumina, ahora nosotros observamos la expresión de 8027 genes (con al menos 12 lecturas en dos bibliotecas) que representan el 67 % del genoma. Encontramos que 570 genes fueron diferencialmente expresados en luz con respecto a oscuridad con una razón de cambio mayor de dos, que representa el 4.8 % del genoma. En el modelo fúngico de la percepción de la luz, *N. crassa*, se ha reportado que

un 4 % del genoma responde diferencialmente por la presencia de la luz (Chen et al. 2009; Wu et al. 2014); en tanto que en *A. nidulans* el 5% del total de genes requiere un recambio en el nivel de expresión (Ruger-Herreros et al. 2011). Lo cual muestra que un número pequeño de genes que son responsivos a estímulos cortos de luz en hongos.

La formación de esporas asexuales por un pulso de luz en *N. crassa*, *A. nidulans* o *A. fumigatus* requiere de un recambio transcripcional desde los primeros minutos de iniciada la inducción (Chen et al. 2009; Fuller et al. 2013; Wu et al. 2014). El complejo fotorreceptor de luz azul WCC en *N. crassa* es responsable de controlar más de 400 genes después de 8 min de luz blanca. Dentro los cuales, 58 genes son factores de transcripción (Wu et al. 2014) y 21 han sido identificados como blancos directos del WCC (Smith et al. 2010). A diferencia de *N. crassa*, en *Aspergillus* el número de factores de transcripción regulados por un estímulo de luz es menor (< 10) o los cambios en su expresión es relativamente baja que no fue suficiente para detectarlas con microarreglos (Ruger-Herreros et al. 2011; Fuller et al. 2013). En nuestros datos detectamos 25 factores de transcripción diferencialmente expresados en ambas cepas, de los cuales 17 mostraron ser reprimidos y 8 inducidos.

La respuesta transcripcional de la cepa  $\Delta blu7$  después de un pulso de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul mostró un número similar de genes responsivos que la CS. De manera interesante, los términos GO de procesos del metabolismo nitrogenado, localización y la respuesta a estrés solo estuvieron presentes en los genes diferencialmente expresados de la CS, sin embargo solo algunos de los genes encontrados han sido descritos. Por otro lado, en la mutante, los genes inducidos encontrados solo en esta cepa fueron relacionados en la categoría de señalización. En esta categoría se anotaron dos genes: una arrestina y la 3'-5' fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. Lo que nos llamó la atención debido a que reportes previos

señalan que la fosfodiesterasa reduce los niveles de AMP cíclico, un segundo mensajero implicado en la conidiación en *T. atroviride* (Grešik et al. 1988).

En *T. atroviride* se ha reportado un cambio súbito de los niveles de AMPc por un pulso de luz (Grešik et al. 1988). Además la adición de AMPc a micelio cultivado en oscuridad mimetiza la inducción de la conidiación por luz. Esto apunta a que los cambios en los niveles de AMPc son percibidos como una señal para la formación de esporas asexuales.

En *T. reesei* la proteína ENVOY, ortólogo de VIVID de *N. crassa*, regula los niveles de AMPc a través de la represión de la fosfodiesterasa (Tisch et al. 2011). Además se postula que ENV1 coordina la regulación de la conidiación a través del AMPc y el estado nutricional por medio de las proteínas G- $\alpha$ , GNA1 y GNA3 (Tisch et al. 2011). En nuestros datos, encontramos mayor inducción de la fosfodiesterasa así como menor expresión de *env1* por el pulso de luz en la mutante  $\Delta$ blu7. Estos datos sugieren que, como en *T. reesei*, la disminución de la expresión de *env1* en la mutante  $\Delta$ blu7 resulta en menor contenido de AMPc, que en consecuencia disminuye la respuesta de conidiación. Sin embargo, la conidiación a fluencias mayores de 150  $\mu\text{molm}^{-2}$  sobrepasa el umbral al cual actúa la fosfodiesterasa sobre el AMPc o existe otro mecanismo de señalización involucrado en la fotoconidiación, como el estrés oxidativo.

La luz es percibida como un agente estresante en varios hongos (Moye-rowley 2003; Apel y Hirt 2004; Yoshida y Hasunuma 2004). El estrés derivado de las especies de oxígeno reactivas (EROs) estimula la diferenciación en *N. crassa*, *Aspergillus* y *Trichoderma* (Belozerskaya y Gessler 2006; Friedl et al. 2008b; Balázs et al. 2010). Las catalasas y superóxido dismutasas se encargan de reducir los niveles EROs a condiciones normales en la célula (Møller 2001; Apel y Hirt 2004). En *N. crassa*, el estrés oxidativo producido por la presencia de la luz es capaz de estimular la formación de estructuras

asexuales (Yoshida y Hasunuma 2004). Por lo que genes relacionados a la conidiación como *con10* que codifica una trehalosa sintasa, es regulado por estrés oxidativo, a través del represor RCO1 (Lee y Ebbole 1998). En *Aspergillus*, el factor de transcripción RsrA (Regulator of stress response, de sus siglas en inglés), en conjunto con otros FT regulan la acumulación de EROs (Bok et al. 2014) (Woo Bok, et al 2014). Las mutantes en *rsrA* son más tolerantes al estrés oxidativo y presentan conidiación disminuida (Bok et al. 2014). Recientemente, en *T. atroviride* genes relacionados a estrés oxidativo fueron identificados después de 30 min de haber sido expuestos a 5 min de luz blanca (García-Esquivel et al. 2016), de forma similar que en *A. fumigatus* una gran cantidad de genes fueron relacionados a respuesta de estrés por la presencia de luz (Fuller et al. 2013). Por lo que EROs son un componente importante en la señalización que da lugar en la conidiación y que requiere mayor atención.

Nosotros observamos la expresión de genes relacionados al estrés en la CS con mayores niveles de inducción que en la cepa mutante. Por ejemplo una catalasa peroxisomal y una citosólica ; así mismo genes de respuesta a estrés como proteínas de choque térmico (*hsp*, del inglés "heat shock proteins") son diferencialmente expresados con un cambio mayor de dos en la CS. En tanto que la mutante no mostró tales genes relacionados a estrés. Esto nos sugiere que la señal de estrés por el pulso de luz está afectada a bajas fluencias de luz. Sin embargo a fluencias mayores de 100  $\mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul la percepción del estrés alcanza el umbral de detección o un mecanismo alterno es activado.

De forma interesante el factor de transcripción *sub-1* (submerged protoperithecia), implicado en la regulación de genes de respuesta tardía a luz en *N. crassa*, está relacionado con la respuesta al estrés oxidativo en *Botrytis cinerea*. Las mutantes  $\Delta\text{bclff1}$  (*sub1*) de *B. cinerea* mostraron mayor sensibilidad al estrés oxidativo provocado con menadiona o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , además

presentaron hifas reducidas y formación precoz de conidias, en abundancia, en presencia de fotoperiodo, lo que indica un rol negativo en la conidiación (Schumacher et al. 2014). En nuestros datos, la expresión de *sub1* presentó mayor inducción por luz en la mutante  $\Delta$ blu7 comparado con la CS (Anexo 1). Si Sub1 de *T. atroviride* también está implicado en la regulación al estrés, como el ortólogo de *B. cinerea*, el incremento de expresión de *sub1* en la mutante  $\Delta$ blu7 podría contribuir en una reducción en la percepción del estrés por el pulso de luz.

En conjunto los datos nos muestran que la disminución de AMPc (por un aumento en la expresión de la fosfodiesterasa), así como de genes de respuesta a estrés (catalasas, hsp) y de mayor inducción de la *sub-1*, dan lugar a una menor conidiación por un pulso de luz en la cepa mutante.

En *T. atroviride*, únicamente el gen *blu7* había sido reportado como factor de transcripción dependiente del complejo regulador y fotorreceptor de luz azul BLRC. En este trabajo encontramos 25 factores de transcripción (Anexo 1) que mostraron un cambio mayor de dos en su nivel de expresión, de los cuales 14 fueron compartidos en la CS y  $\Delta$ blu7. En tanto que 7 FT mostraron cambio en su expresión solo en la CS y 4 en la mutante. Lo que indica la incapacidad para responder correctamente al pulso de luz podría deber a la ausencia de estos FT. La mayoría fueron identificados con dominios de unión a ADN con dedos de zinc tipo Zn2Cys2 (12) y C2H2 (5). Solo algunos han sido descritos con función conocida (7) en tanto que los restantes permanecen como proteínas hipotéticas. A diferencia de *sub1*, observamos que *cp2* y *azf1* fueron inducidas a un nivel similar en la mutante y la silvestre (Anexo 1). Se ha observado un incremento en la expresión del gen *cp2* en varios estudios con pulsos de luz. El ortólogo en *N. crassa* *grhl-1* está involucrado en la liberación de esporas por remodelación de la pared celular, en tanto que *azf1*, dependiendo de la

fuentes de carbono, regula genes del metabolismo de carbono o de la pared celular (Slattery et al. 2006).

Por otro lado en el grupo de genes que codifican para factores de transcripción reprimidos, encontramos a dos genes *xlnr* (transcriptional activator), un *mads-box* *mef2* (*myocyte enhancer factor2*) y a *crz1* (*calcineurin-responsive zinc finger*) descritos en la literatura. XlnR en *A. niger* regula genes relacionados a la formación de xilanas, Mef2 de *S. cerevisiae* ha sido relacionado en procesos de respiración celular y Crz1, de varios hongos está involucrado, en la regulación génica mediado por calcio (Thewes 2014). Esto nos indica que la ausencia de *blu7*, modificó el sistema de regulación de varios factores de transcripción que en conjunto pueden influir en la disminución de la respuesta de conidiación en la mutante.

### **6.2.0 Reducción del crecimiento por presencia de luz constante es aumentado por ausencia de *blu7***

La reducción del crecimiento causada por luz constante en *T. atroviride* se incrementa por la ausencia de los genes *blr1* o *blr2*. Por lo que nos preguntamos si la ausencia de *blu7* en luz constante afectó el crecimiento en la mutante, como en la conidiación por pulsos breves de luz.

El crecimiento radial de la CS o de la mutante fue similar en la oscuridad, a diferencia de los cultivos en luz constante. Los cultivos de ambas cepas en medio rico, como el PDA, mostraron que la CS en presencia de luz mantuvo gran tolerancia a varias intensidades de luz azul; en tanto que la mutante  $\Delta blu7$ , con intensidades elevadas de luz azul ( $> 5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) mostró menor diámetro de la colonia, indicando una disminución en la tolerancia a altas intensidades de luz. En *T. atroviride* se ha reportado menor crecimiento radial por la presencia de luz azul o roja sobre mutantes de *blr1* o *blr2* (Casas Flores et al. 2004). En *Cryptococcus neoformans* la luz

inhibe el crecimiento filamentoso de la fructificación haploide por la percepción de luz de los WC (Idnurm y Heitman 2005b). Así mismo se ha reportado para varios hongos un efecto negativo por la presencia de la luz (Nambudiri et al. 1973; Corrochano et al. 2006; Lee et al. 2006; Hatakeyama et al. 2007). Para los hongos que viven en la profundidades del suelo, la percepción de la luz puede ayudarles a percibir un entorno hostil al cual se van a enfrentar de acuerdo al momento del día (Rodríguez-Romero et al. 2010).

La baja tolerancia a la luz constante por parte de las mutantes  $\Delta blu7$ , fue más evidente cuando fueron cultivadas en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono. El fenotipo de crecimiento de las mutantes  $\Delta blu7$  fue similar al mostrado por la mutante *env1* de *T. reesei*, ya que la inhibición del crecimiento radial se observa en presencia de luz. Aunque a diferencia de la mutante  $\Delta env1$  de *T. reesei*, la formación de esporas asexuales no fue bloqueada en la mutante  $\Delta blu7$ , pero la producción de conidias fue menor que la CS. Por otro lado, la mutante  $\Delta env1$  de *T. atroviride* mostró menor crecimiento que la cepa silvestre en presencia de luz, pero mayor producción de conidias en medio PDA, el cual está relacionado con el rol en fotoadaptación de ENV1 sobre genes responsivos a luz (Beltran Hernández y Herrera-Estrella 2013). Los cuales se mantienen mayor tiempo encendidos en la mutante  $\Delta env1$  de *T. atroviride*, al no estar presente ENVOY para apagar la respuesta a luz y prepararse para futuros estímulos. En tanto que en medio mínimo con glucosa, el crecimiento de  $\Delta env1$ , de *T. atroviride*, fue menor que el de la CS, así como la cantidad de esporas producidas por la mutante en presencia de luz azul (Beltran Hernández y Herrera-Estrella 2013). Interesantemente, la expresión de *env1* en la mutante  $\Delta blu7$  fue mayor que en la CS en medio mínimo con glucosa bajo luz constante. En *T. reesei*, ENV1 es capaz de disminuir la actividad de fosfodiesterasa y conecta la toma de nutrientes a través de la

regulación de las proteínas G, GNA1 y GNA3 (Tisch et al. 2011). En nuestros datos observamos que por un pulso de luz, la expresión de *env1* fue menor en la mutante  $\Delta blu7$  comparado con la cepa silvestre, pero en medio mínimo suplementado con glucosa y bajo luz constante, la expresión de *env1* fue mayor en la mutante que en la cepa silvestre. Dado que ambas proteínas son dependientes de los fotoreceptores BLR1 y BLR2, y que los fenotipos de  $\Delta blu7$  y  $\Delta env1$ , son influenciados por la presencia de la luz, esto sugiere una posible interacción entre ambas proteínas, para la respuesta a luz. Sin embargo se requieren mayores investigaciones para soportar esta hipótesis.

La respuesta transcripcional de la mutante  $\Delta blu7$  y CS en presencia de luz constante con glucosa como única fuente de carbono, mostró grandes cambios en genes relacionados al metabolismo, comparado con su control de oscuridad. Dado que el crecimiento de la mutante  $\Delta blu7$  en la oscuridad fue similar que la CS, la asimilación o metabolismo de la glucosa no parece estar bloqueado o deficiente, sino más bien la respuesta de la regulación génica por la presencia de la luz es deficiente. Lo que nos sugiere que *Blu7* requiere de la activación por la luz o por la interacción de una proteína regulada por luz.

La anotación funcional de los genes diferenciales inducidos en la mutante  $\Delta blu7$  y la CS nos mostró que la categoría de función molecular con actividad de hidrolasa fue enriquecida únicamente en la CS, en tanto que las demás categorías, estuvieron presentes en ambas. Para los genes reprimidos de ambas cepas encontramos menos categorías funcionales enriquecidas, en las cuales genes involucrados en la periferia celular (Proteasa alcalina extracelular, serina endopeptidasas extracelulares, glucanasas de pared celular extracelular) fueron enriquecidos únicamente en la CS. De forma destacable, las categorías enriquecidas en procesos biológicos relacionados a localización, establecimiento de la localización y

transporte fueron encontradas en los genes inducidos de la mutante y las mismas categorías también fueron encontradas en los genes reprimidos de la CS. Los genes de esas categorías, con comportamiento opuesto en ambas cepas, codifican para transportadores de azúcares, aminoácidos y de múltiples fármacos.

Interesantemente, encontramos dos genes *nmrA* (nitrogen metabolic repression protein A, lds. 230450, 35890) inducidos en luz constante en ambas cepas. A diferencia del gen *nmrA* con ld 230450 que mostró el mismo nivel de inducción en ambas cepas, la inducción del gen *nmrA* con ld 35890 fue dos veces mayor en la CS que lo observado en la cepa mutante. NMR de *A. nidulans*, es un regulador negativo en la represión metabólica por nitrógeno, que controla la expresión de genes que codifican enzimas y permeasas necesarias para el uso de diversas fuentes de nitrógeno (Andrianopoulos et al. 1998; Wilson y Arst 1998). En *N. crassa*, la ausencia de *nmr-1*, incrementa la actividad de nitrato reductasa y de glutamina sintetasa, incluso en condiciones de represión metabólica por nitrógeno (Andrianopoulos et al. 1998). En *Magnaporthe oryzae* el sensor de glucosa-6-fosfato, TPS1 (Trehalosa-6-fosfato sintasa) regula negativamente a NMR a través de la represión de los genes *nmr1-3*, además regula al transportador de múltiples fármacos y de extrusión de toxinas (MATE), Mdt1, involucrado en la asimilación de glucosa, conidiación y virulencia (Fernandez et al. 2012). En nuestros datos también encontramos genes relacionados al transporte de monosacáridos y de azúcares en general, además de transportadores de múltiples fármacos inducidos en la cepa mutante y reprimidos en la CS. En conjunto, la menor expresión de *nmrA* en la mutante  $\Delta blu7$  nos sugiere que, en medio mínimo con glucosa, presenta una desregulación del metabolismo del nitrógeno y del carbono, por presencia de la luz, que permite la expresión de genes relacionados al transporte de aminoácidos.

La velocidad de alargamiento de la hifa depende en gran medida de la fuente de nutrientes disponibles para el hongo (Irniger et al. 2000; Rolland et al. 2002; Krystofova y Borkovich 2006; Brunner et al. 2008). En *T. atroviride* la repuesta de conidiación o de crecimiento en presencia de luz depende de la fuente de carbono y de las proteínas BLR1 o BLR2 (Casas-Flores et al. 2006; Friedl et al. 2008a; Friedl et al. 2008b). La limitación de la fuente de carbono o de nitrógeno resulta en la formación menos hifas ramificadas compactas que aquellas observadas en medio rico, además la remoción repentina de la fuente de carbono o de nitrógeno estimula la formación del anillo de conidiación de forma similar que un pulso de luz (Casas-Flores et al. 2006). Interesantemente, en ausencia de *blr1* o *blr2*, se pierde la conidiación por limitación de carbono, sin embargo la privación de nitrógeno aún puede estimular la conidiación, sugiriendo un mecanismo de regulación alterno para la formación de esporas asexuales independiente de los *blr* (Casas-Flores et al. 2006). Por tal motivo, nos preguntamos si el metabolismo de nitrógeno podría estar involucrado en el crecimiento de las hifas bajo luz constante.

Como primer acercamiento, encontramos varios genes inducidos en la CS que codifican enzimas con actividad de peptidasa (papain-cisteina proteasa, precursor de candipeptidasa-3, proteasa de la fam a1, serina-proteasa microbiana, serina-proteasa extracelular alcalina), incluyendo una serin-proteasa, sugiriendo que la degradación de proteínas o el reciclaje de las fuentes de nitrógeno es estimulado en respuesta a luz. Lo cual se ha observado también en *N. crassa*, donde genes relacionados al metabolismo del nitrógeno son regulados por la presencia de la luz (Chen et al. 2009; Wu et al. 2014). En el mismo sentido, encontramos un gen (allantoinasa, Id 300514) relacionado al metabolismo de las purinas inducido en la CS. Así mismo, observamos dos allantoinato permeasas (Ids 257840, 127784) reprimidas en la CS, que en la mutante  $\Delta$ blu7 tienen baja

represión. En tanto que en la mutante  $\Delta blu7$  encontramos dos permeasas de allantoato (Id. 302043, 35866) inducidos. El allantoato se ha encontrado en plantas como fuentes de nitrógeno de almacenamiento, los cuales son metabolitos intermediarios de la degradación de purinas (Andrea K. Werner, 2007). En el hongo *Coniothyrium minutans* se detectaron genes de allantoato permeasas durante el micoparasitismo de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, como parte del sistema utilizado para reciclar los nutrientes (Muthumeenakshi et al. 2007). Esto nos sugiere que el reciclaje de nutrientes, en este caso de nitrógeno está más activo en la mutante  $\Delta blu7$  comparado con la CS. De hecho, observamos que el transporte de aminoácidos, en su mayoría transportadores de metionina, fue reprimido en la CS. En contraste,  $\Delta blu7$  presentó altos niveles de inducción de genes que codifican transportadores de aminoácidos y de allantoato. Los cuales son altamente coincidentes con la respuesta a limitación de nitrógeno en el hongo fitopatogénico *M. grisea*.

En conjunto, nuestros datos nos indican que la ausencia de *blu7* mimetiza la respuesta de condiciones de bajo nitrógeno cuando es expuesto a luz constante, lo que resulta en la reducción del crecimiento. La restauración de la velocidad de crecimiento y tamaño radial de la colonia en la CS y mutante por la adición de peptona al medio de cultivo (Figura 21) sugiere que la inhibición del crecimiento por la luz es debido mayormente al metabolismo intracelular del nitrógeno, y el rol de *Blu7* en la respuesta es indirecto, cuando la colonia es expuesta a luz bajo condiciones pobres de nitrógeno. Como consecuencia de la ausencia de *Blu7*, las mutantes tienen menor capacidad para reciclar las fuentes de nitrógeno, por lo que genes relacionado al transporte de aminoácidos son inducidos, los cuales en presencia de los péptidos y aminoácidos libres de la peptona son tomados y metabolizados eficientemente dando lugar a un mejor crecimiento.

Por otro lado, también observamos que el gen *ras* que codifica una GTPasa (*rsr1*, Id. 300901), fue inducido a mayores niveles en la cepa mutante  $\Delta blu7$  (FC= 5.2) que en la CS (FC= 2.0). En levaduras la disponibilidad de glucosa involucra la señalización por RAS y la activación de receptores acoplados a proteínas G (Irniger et al. 2000; Rolland et al. 2002). En nuestros datos observamos dos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) expresados en ambas cepas, pero el GPCR con Id. 40423 fue más inducido en la mutante, que podría actuar como un regulador río arriba. Los GPCRs están involucrados en la percepción de aminoácidos y de la fuente de carbono así como en la percepción de AMPc (Rolland et al. 2002; Bahn et al. 2007; Li et al. 2007; Dechant y Peter 2008). El gen *gpr1* de *T. atroviride* (Id. 83166), que codifica un homólogo de Gpr1 de *N. crassa* (Krystofova y Borkovich 2006; Brunner et al. 2008), fue inducido únicamente en la CS. El silenciamiento de *gpr1* en la cepa P1 de *T. atroviride* resultó en la reducción del crecimiento, la conidiación y la producción de metabolitos secundarios (Brunner et al. 2008). En *S. cerevisiae* la ruta de señalización por GPR1-GPA2 en presencia de glucosa está involucrado en la regulación de AMPc (Rolland et al. 2002; Santangelo 2006). La disminución de la expresión de *gpr1* en las mutantes  $\Delta blu7$ , podría afectar la percepción de glucosa en el medio, lo cual daría lugar a la inducción de genes transportadores de monosacáridos observada, en tanto que en la CS la mayor expresión de la hexocinsa1 y que el transportador de hexosas, es posible que la señalización por AMPc sea mantenida.

En nuestros datos observamos un total de 59 factores de transcripción responsivos al tratamiento con luz blanca constante en ambas cepas. Encontramos que, además de *nmrA*, otros 8 genes de factores de transcripción mostraron cambios mayores en la respuesta en la CS que en la mutante. El gen con Id. 314352, que codifica un proteína con un dominio

de unión a ADN de dos de zinc tipo Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>, presentó un cambio de 142.8 en la silvestre, en tanto que en la mutante fue de 8.5, que aunque no ha sido descrita una función para este gen, es un candidato para futuras investigaciones. Así mismo encontramos que dos genes que codifican factores de transcripción tipo Zn<sub>2</sub>cys<sub>6</sub> (Id. 87055) y C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (87958) fueron inducidos en la CS con un cambio de más de dos veces con respecto a la oscuridad, que en la mutante se mostraron reprimidos. Lo que aumenta el grado de complejidad en la respuesta, ya que estos factores de transcripción no han sido previamente estudiados.

Por otro lado también observamos que 25 genes asociados a FT que presentaron mayores cambios en su expresión en la mutante comparado con la CS, de los cuales 7 mostraron 0.5 veces mayor cambio. Dentro de esta lista encontramos a *flbC*, ortólogo de *flbC* de *A. nidulans*, con un cambio de 2.37 en la cepa mutante  $\Delta$ blu7, en tanto que la CS presentó un cambio de 1.4. En *A. nidulans* *flbC* se expresa durante todo el ciclo de vida, en la fase vegetativa, fase sexual y asexual, además es responsivo a un pulso de luz (Kwon et al. 2010; Ruger-Herreros et al. 2011); las mutantes  $\Delta$ *flbC* tienen reducida o retarda la conidiación, en tanto que la sobreexpresión de *flbC* inhibe la formación del conidióforo y del crecimiento de la hifa (Kwon et al. 2010), por lo que se requiere de la dosis correcta de expresión de este gen para el desarrollo y crecimiento, debido a que por si mismo es capaz de regular genes controladores de la conidiación en *A. nidulans*, como *blrA*, *abaA* y *vosA* (Kwon et al. 2010). Lo que podría sugerir que, el aumento de expresión de *flbC* en la mutante  $\Delta$ blu7 en luz constante contribuye al fenotipo de inhibición del crecimiento y de la conidiación. Además de *flbC*, también observamos dos genes con dos veces mayor cambio en la mutante que en la cepa silvestre, uno de ellos fue más inducido (Id.210223; CS=3.19,  $\Delta$ blu7=7.17 ) y el otro reprimido (Id. 258080; CS=0.74,  $\Delta$ blu7=0.36). Por lo que la ausencia de blu7 en

presencia de luz constante por 60 h resulta en un desajuste de reguladores de la transcripción que si son relevantes o no para la respuesta a luz, necesitara de mayores estudios.

En resumen presentamos una perspectiva de la respuesta a luz en *T. atroviride* de acuerdo a nuestros datos en la figura 22. La percepción de luz es recibida por el complejo BLRC, el cual induce, entre otros genes, la expresión de *blu7*. De forma indirecta, *Blu7* regula negativamente la expresión de la fosfodiesterasa, lo cual permite el incremento de AMPc y la posterior activación de PKA, que regula genes relacionados a conidiación. En presencia de luz constante la respuesta a la luz es dependiente de la fuente de nitrógeno, controlando el transporte del mismo del medio o movilizándolo el nitrógeno almacenado.

### **6.3.0 Factores adicionales que regulan la respuesta a luz**

Recientemente se reportaron 11 factores de transcripción regulados por un pulso de luz en *T. atroviride*, de los cuales 9 son dependientes de los BLR (García-Esquivel et al. 2016). Los genes *nmr-1*, *cp2*, *blu7* y *sah1* fueron regulados también en nuestros datos por un pulso de luz o luz constante, en tanto que los siete restantes no mostraron ser expresados diferencialmente. En nuestros datos utilizamos  $100 \mu\text{molm}^{-2}$  de luz azul para estimular la fotoconidiación, en tanto que en el trabajo anterior se utilizaron dosis saturantes ( $>1200 \mu\text{molm}^{-2}$ ) de luz blanca. A pesar de que el estímulo de luz fue menor en nuestros estudios la profundidad de la secuenciación en nuestros datos fue mayor, esto podría explicar el porque encontramos más factores de transcripción con menor cantidad de luz.

Hasta ahora el fenotipo presentado por  $\Delta\text{blu7}$  muestra que esos factores de transcripción son requeridos para la conidiación el algún grado, sin embargo la caracterización fenotípica de la mutante del gen con Id. 144148 (*c6blu*), que codifica para una proteína con dedos de zinc tipo

Zn2Cys6, no mostró alteraciones en la conidiación por un pulso de luz o por luz constante (Figura 6, 7).

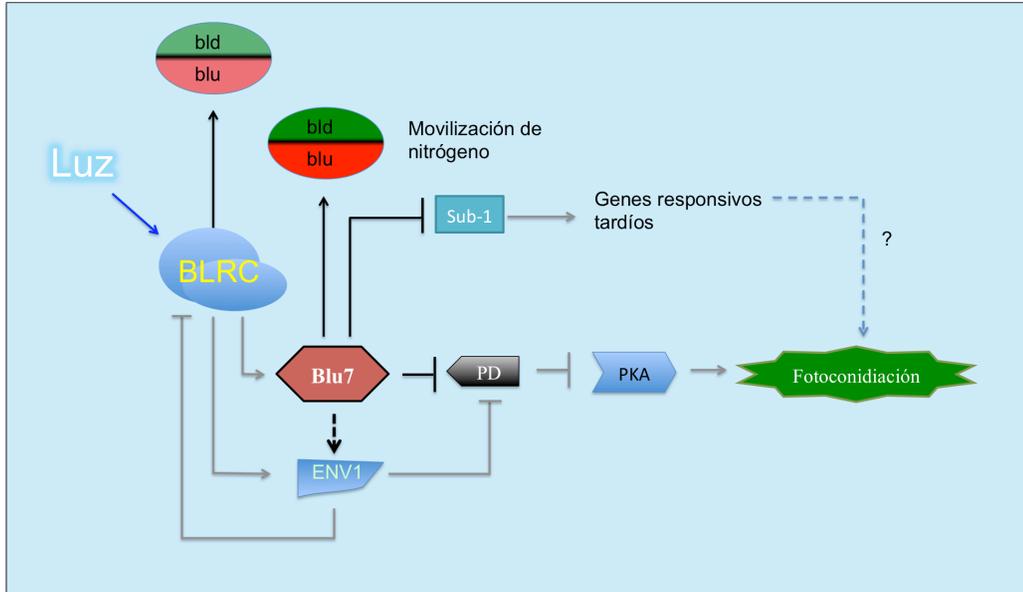
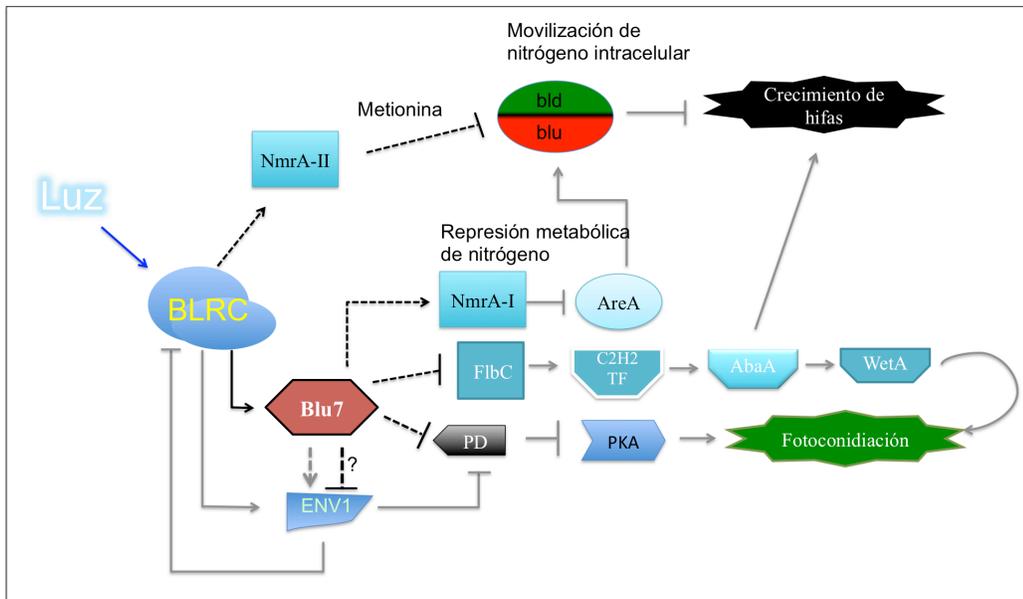
La caracterización fenotípica bajo ciertas fuentes de carbono evaluadas mostró ser similar, si no igual, que la cepa parental, por lo que para las condiciones evaluadas, el gen *cóblu* (Id. 144148) no se encuentra relacionado a la conidiación o al crecimiento. Sin embargo, su relación con otras condiciones como el estrés oxidativo o el daño mecánico o una combinación de las mismas deberán ser evaluadas.

El gen *sub1* de *T. atroviride* mostró un cambio de expresión mayor de dos después de un pulso de luz. La ausencia del gen *sub1* en *T. atroviride* resultó en hiper-conidiación tanto en presencia de luz como en oscuridad. En *N. crassa* la ausencia de *sub-1* presentó estructuras sexuales protoperitecios en medio líquido, condición que normalmente las inhibe (Colot et al. 2006). Además, las mutantes perdieron la expresión de genes de respuesta tardía por un pulso de luz, sin embargo la sobreexpresión no presentó fenotipo alguno, lo que sugiere que SUB1 requiere de la interacción con otras proteínas o una activación por luz (Chen et al. 2009). Por otro lado, en *B. cinerea* la presencia de *bcltf1*, ortólogo de *sub-1* de *N. crassa*, es necesario para el crecimiento en medio mínimo independientemente de la luz. Además la mutante  $\Delta bcltf1$  presentó mayor conidiación que la cepa CS después de varias semanas de cultivo, en tanto que la sobreexpresión de *bcltf1* no presentó reproducción asexual, al igual que la cepa mutante (Schumacher et al. 2014).

Nosotros observamos que la mutante  $\Delta sub1$  de *T. atroviride* presentó conidiación constitutiva desde las 20 h de cultivo y se observaron conidióforos completos desde las 24 h., tanto en luz como en oscuridad. Los conidióforos de la mutante después de 72 h de cultivo fueron más ramificados que en la CS, tanto de luz como de oscuridad. Interesantemente dentro del medio sólido se observaron hifas que

avanzaron mucho antes que las hifas vegetativas de la superficie, las cuales presentaron clamidosporas en algunas de ellas. Normalmente estas estructuras son formadas en condiciones de mayor estrés, ya que son más resistentes que las conidias (Bae y Knudsen 2000; Küçük y Kivanç 2003; Li et al. 2005; Simkovič et al. 2008). Esto nos sugiere que Sub1 en *T. atroviride* es un regulador negativo global de la reproducción asexual.

La expresión de *sub1* en la cepa silvestre debe ser regulado negativamente para permitir la conidiación o un regulador negativo activado por luz debe estar presente para bloquear a Sub1. El hecho que en nuestros datos aparezca inducido por el pulso de luz podría corresponder a la percepción del estrés posiblemente preparándose para mitigar EROs. Sin embargo, se requieren estudios más profundos sobre este campo ya que el mecanismo de regulación de la reproducción asexual por Sub-1 es más complejo, ya que no solo controla la conidiación sino la formación de clamidosporas, por lo que la interacción con otras proteínas debe ser necesaria, así como la dependencia de si las hifas están expuestas a la superficie o sumergidas.

**A****Pulso de luz azul****B****Luz blanca constante**

**Figura 22.** Modelo del papel del regulador transcripcional Blu7 de *T. atroviride* en la respuesta molecular a luz. **A)** Respuesta molecular a un pulso de luz azul. La exposición de *T. atroviride* a bajas fluencias de luz percibidas por el BLRC resulta en la activación transcripcional de los genes *blu7*, *sub-1*, *azf1*, *xlnR* y otros 20 FT. Blu7 controla la fotoconidiación a través de la represión de la fosfodiesterasa (PD). De igual manera, la

inducción de *env1* disminuye aún más la expresión de PD, mientras que la acumulación de cAMP activa a PKA que activa genes relacionados a fotoconidiación. La movilización de nitrógeno (transportadores de aminoácidos) es regulado indirectamente por Blu7 que modula el balance entre conidiación y crecimiento. **B)** Respuesta molecular por exposición a luz continua. Bajo luz blanca continua, la inducción de *blu7* por BLRC es regulado por la fuente de carbono presente en el medio de cultivo. ENV1 regula negativamente genes blanco de BLRC para su adaptación a luz constante. Cuando la fuente de carbono es glucosa, *blu7* limita la inducción de *env1*. Blu7 es requerido para la movilización de nitrógeno a través de la inhibición del ortólogo de AREA, a través del regulador negativo NMRA. Además el crecimiento de la hifa y la conidiación es fuertemente regulada por la cantidad de FlbC para inducir la expresión secuencial de los Fst AbaA y wetA.

Las líneas negras indican puntos de control soportadas por nuestros datos de RNA-seq y las líneas en gris son basadas evidencias experimentales reportadas.

## 7.0.0 CONCLUSIONES

La presencia del gen *blu7* es necesaria para la fotoconidiación a bajas fluencias de luz azul. Sin embargo, aunque a dosis altas de luz la fotoconidiación en la mutante es observada, la producción de conidias es menor que la cepa silvestre, lo que nos indica que Blu7 participa en la intensidad de la respuesta a un pulso corto a luz.

La secuenciación masiva aportó evidencia de la expresión del transcrito completo de *blu7*, previamente descrito por microarreglos.

Blu7 requiere de la presencia de la luz para su activación o de interacción con proteínas activadas por la luz para regular la respuesta de fotoconidiación.

Blu7 participa en la tolerancia del stress por la presencia de luz constante en condiciones mínimas de nitrógeno.

Sub1 de *T. atroviride* se perfila como un regulador negativo de la reproducción asexual.

C6blu no participa en la fotoconidiación de *T. atroviride* a pesar de ser inducido por luz.

## 8.0.0 PERSPECTIVAS

Determinar si Blu7 interactúa con alguna proteína en presencia de luz por medio de dos híbridos.

Realizar ensayos con inhibidores de la fosfodiesterasa en mutantes de *blu7*, así como determinar los niveles de actividad de PKA en presencia de luz azul, para confirmar su participación en la regulación de la señalización por AMPc.

Validar la funcionalidad del dominio de unión a ADN de la proteína predicha por el gen *blu7* para evidenciar su función como factor de transcripción.

Obtener una sobreexpresante completa del gen *blu7* para confirmar su participación en la respuesta a luz.

Determinar la expresión de *blu7* en el fondo mutante  $\Delta env1$  o la expresión de *env1* en el fondo mutante de  $\Delta blu7$  en respuesta a luz y en ensayos de fotoadaptación para esclarecer un poco más su participación en este proceso.

Abordar el metabolismo del nitrógeno y su relación con Blu7 y ENV1.

## 9.0.0 BIBLIOGRAFÍA

- Adams TH, Wieser JK, Yu J-H (1998) Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:35-54.
- Andrianopoulos A, Kourambas S, Sharp JA, et al (1998) Characterization of the *Aspergillus nidulans* nmrA Gene Involved in Nitrogen Metabolite Repression. *J Bacteriol* 180:1973-77.
- Apel K, Hirt H (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-99. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, Penttilä ME (2001) ACEII, a Novel Transcriptional Activator Involved in Regulation of Cellulase and Xylanase Genes of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 276:24309-14. doi: 10.1074/jbc.M003624200
- Bae Y-S, Knudsen GR (2000) Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with  $\beta$ -Glucuronidase and Green Fluorescent Protein Genes Provides a Useful Tool for Monitoring Fungal Growth and Activity in Natural Soils. *Appl Environ Microbiol* 66:810-15.
- Bahn Y, Xue C, Idnurm A, et al (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* 5:57-69. doi: 10.1038/nrmicro1578
- Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC (2011) The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Rev* 1:1-16. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00288.x
- Balázs A, Pócsi I, Hamari Z, et al (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* 283:289-303. doi: 10.1007/s00438-010-0513-z
- Ballario P, Talora C, Galli D, et al (1998) Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Mol Microbiol* 29:719-29.

- Ballario P, Vittorioso P, Magrelli A, et al (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* 15:1650-57.
- Bayram Ö, Biesemann C, Krappmann S, et al (2008a) More Than a Repair Enzyme: *Aspergillus nidulans* Photolyase-like CryA Is a Regulator of Sexual Development. *Mol Biol Cell* 19:3254-62. doi: 10.1091/mbc.E08
- Bayram O, Braus GH, Fischer R, Rodriguez-Romero J (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* 47:900-08. doi: 10.1016/j.fgb.2010.05.008
- Bayram Ö, Krappmann S, Ni M, et al (2008b) VelB / VeA / LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science* (80- ) 320:1504-06. doi: 10.1126/science.1155888
- Bejarano ER, Avalos J, Lipson ED, Cerdá-olmedo E (1990) Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*. *Planta* 183:1-9.
- Belden WJ, Larrondo LF, Froehlich AC (2007) The band mutation in *Neurospora crassa* is a dominant allele of *ras-1* implicating RAS signaling in circadian output. *Genes Dev* 21:1494-1505. doi: 10.1101/gad.1551707
- Belozerskaya TA, Gessler NN (2006) Oxidative Stress and Differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology* 75:497-501. doi: 10.1134/S0026261706040102
- Beltran Hernández EB, Herrera-Estrella AH (2013) Envoy en la Fotorrespuesta de *Trichoderma atroviride*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7:249-60.
- Bergman K, Burke P V, Cerdá-Olmedo E, et al (1969) *Phycomyces*. *Bacteriol Rev* 33:99-157.
- Berrocal-Tito GM, Rosales-Saavedra T, Herrera-Estrella A, Horwitz BA (2000) Characterization of Blue-light and Developmental Regulation of the

- Photolyase gene *phr1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem Photobiol* 71:662-68.
- Betina V, Spišáková J (1976) Suppression of photo-induced sporulation in *Trichoderma viride* by inhibitors. *Folia Microbiol (Praha)* 21:362-70. doi: 10.1007/BF02876962
- Bieszke J a, Braun EL, Bean LE, et al (1999) The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8034-9.
- Blumenstein A, Vienken K, Tasler R, et al (2005) The *Aspergillus nidulans* Phytochrome FphA Represses Sexual Development in Red Light. *Curr Biol* 15:1833-38. doi: 10.1016/j.cub.2005.08.061
- Bok JW, Keller NP (2004) *LaeA* , a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp . *Eukaryot Cell* 3:527-535. doi: 10.1128/EC.3.2.527
- Bok JW, Wiemann P, Garvey GS, et al (2014) Illumina identification of *RsrA* , a conserved C2H2 transcription factor coordinating the NapA mediated oxidative stress signaling pathway in *Aspergillus*. 15:1-13. doi: 10.1186/1471-2164-15-1011
- Boylan MT, Mirabito PM, Willett CE, et al (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 7:3113-18.
- Brunner K, Omann M, Pucher ME, et al (2008) *Trichoderma* G protein-coupled receptors : functional characterisation of a cAMP receptor-like protein from *Trichoderma atroviride*. *Curr Genet* 54:283-99. doi: 10.1007/s00294-008-0217-7
- Calvo AM (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* 45:1053-1061. doi: 10.1016/j.fgb.2008.03.014
- Casas Flores S, Rios Momberg M, Bibbins M, et al (2004) BLR-1 and BLR-2, key

- regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150:3561-69. doi: 10.1099/mic.0.27346-0
- Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Rosales-Saavedra T, et al (2006) Cross Talk between a Fungal Blue-Light Perception System and the Cyclic AMP Signaling Pathway. *Eukaryot Cell* 5:499-506. doi: 10.1128/EC.5.3.499
- Castrillo M, Avalos J (2015) The flavoproteins CryD and VvdA cooperate with the white collar protein WcoA in the Control of photocarotenogenesis in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS One* 10:1-22. doi: 10.1371/journal.pone.0119785
- Cetz-Chel JE, Herrera-Estrella AH (2009) ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL GEN velvet (veTa) DE *Trichoderma atroviride*. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD IRAPUATO
- Chen C-H, Dunlap JC, Loros JJ (2010) *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet Biol* 47:922-29. doi: 10.1016/j.fgb.2010.07.005
- Chen C-H, Ringelberg CS, Gross RH, et al (2009) Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J* 28:1029-42. doi: 10.1038/emboj.2009.54
- Chen M, Chory J, Fankhauser C (2004) LIGHT SIGNAL TRANSDUCTION IN HIGHER PLANTS. *Annu Rev Genet* 38:87-117. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.092259
- Chitarra GS, Abee T, Rombouts FM, et al (2004) Germination of *Penicillium paneum* Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol , a Volatile Self-Inhibitor. *70:2823-2829*. doi: 10.1128/AEM.70.5.2823
- Christie JM (2007) Phototropin Blue-Light Receptors. *Annu Rev Plant Biol* 58:21-45. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103951
- Colot H V, Park G, Turner GE, et al (2006) A high-throughput gene knockout

- procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10352-57. doi: 10.1073/pnas.0601456103
- Conesa A, Götz S (2008) Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int J Plant Genomics* 2008:619832. doi: 10.1155/2008/619832
- Conesa A, Götz S, García-gómez JM, et al (2005) Blast2GO : a universal tool for annotation , visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-76. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610
- Corrochano LM (2007) Fungal photoreceptors : sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem Photobiol Sci* 6:725-36. doi: 10.1039/b702155k
- Corrochano LM, Garre V (2010) Photobiology in the Zygomycota : Multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet Biol* 1-7. doi: 10.1016/j.fgb.2010.04.007
- Corrochano LM, Sanz C, Iturriaga EA, et al (2006) The *Phycomyces mada* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses.
- Dechant R, Peter M (2008) Nutrient signals driving cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 20:678-87. doi: 10.1016/j.ceb.2008.09.009
- Dynlacht BD, Attardi LD, Admon A, et al (1989) Functional analysis of NTF-1 , a developmentally regulated *Drosophila* transcription factor that binds neuronal CIS elements. 1677-1688. doi: 10.1101/gad.3.11.1677
- Esquivel-Naranjo EU (2007) " ANÁLISIS MOLECULAR DE LA PERCEPCIÓN DE LUZ EN *Trichoderma atroviride*". Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
- Estrada AF, Avalos J (2008) The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis , but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation. *Fungal Genet Biol*

45:705-18. doi: 10.1016/j.fgb.2007.12.003

Fankhauser C, Staiger D (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* 216:1-16. doi: 10.1007/s00425-002-0831-4

Fernandez J, Wright JD, Hartline D, et al (2012) Principles of Carbon Catabolite Repression in the Rice Blast Fungus: Tps1, Nmr1-3, and a MATE-Family Pump Regulate Glucose Metabolism During Infection. *PLoS Genet* 8:e1002673. doi: 10.1371/journal.pgen.1002673

Friedl MA, Kubicek CP, Druzhinina IS (2008a) Carbon Source Dependence and Photostimulation of Conidiation in *Hypocrea atroviridis*. *Appl Environ Microbiol* 74:245-50. doi: 10.1128/AEM.02068-07

Friedl MA, Schmoll M, Kubicek CP, Druzhinina IS (2008b) Photostimulation of *Hypocrea atroviridis* growth occurs due to a cross-talk of carbon metabolism, blue light receptors and response to oxidative stress. *Microbiology* 154:1229-41. doi: 10.1099/mic.0.2007/014175-0

Froehlich AC, Chen C-H, Belden WJ, et al (2010) Genetic and Molecular Characterization of a Cryptochrome from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 9:738-50. doi: 10.1128/EC.00380-09

Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297:815-9. doi: 10.1126/science.1073681

Froehlich AC, Noh B, Vierstra RD, et al (2005) Genetic and Molecular Analysis of Phytochromes from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 4:2140-2152. doi: 10.1128/EC.4.12.2140

Fuller KK, Ringelberg CS, Loros JJ, Dunlap JC (2013) The Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Regulates Growth, Metabolism, and Stress Resistance in Response to Light. *MBio* 4:e00142-13. doi: 10.1128/mBio.00142-13.Editor

Galland P (1990) Phototropism of the *Phycomyces* sporangiophore: a

- comparison with higher plants. *Photochem Photobiol* 52:233-248.
- Galland P, Lipson ED (1987) Blue-light reception in *Phycomyces* phototropism: Evidence for two photosystems operating in low- and high-intensity ranges. *Proc Natl Acad Sci* 84:104-8.
- Galun E (1971) Scanning Electron Microscopy of Intact *Trichoderma* Colonies. *J Bacteriol* 108:938-940.
- Galun E, Gressel J (1966) Morphogenesis in *Trichoderma*: Suppression of Photoinduction by 5-Fluorouracil. *Science* (80- ) 151:696-98.
- García-Esquivel M, Esquivel-Naranjo EU, Hernández-Oñate MA, et al (2016) The *Trichoderma atroviride* cryptochrome/photolyase genes regulate the expression of *blr1*-independent genes both in red and blue light. *Fungal Biol* 120:500-12. doi: 10.1016/j.funbio.2016.01.007
- García-Martínez J, Brunk M, Avalos J, Terpitz U (2015) The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination. *Sci Rep* 5:7798. doi: 10.1038/srep07798
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, et al (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36:3420-35. doi: 10.1093/nar/gkn176
- Graafmans WDJ (1977) Effect of Blue Light on Metabolism in *Penicillium isariiforme*. *J Gen Microbiol* 101:157-61.
- Grešík M, Kolarova N, Farkas V (1988) Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride*. *Exp Mycol* 12:295-301. doi: 10.1016/0147-5975(88)90021-7
- Grešík M, Kolarova N, Farkas V (1991) Hyperpolarization and intracellular acidification in *Trichoderma viride* as a response to illumination. *J Gen Microbiol* 137:2605-09. doi: 10.1099/00221287-137-11-2605
- Grešík M, Kolarova N, Farkaš V (1989) Light-stimulated phosphorylation of proteins in cell-free extracts from *Trichoderma viride*. *FEBS Lett* 248:185-187. doi: 10.1016/0014-5793(89)80458-2

- Gressel J, Galun E (1967) Morphogenesis in *Trichoderma*: Photoinduction and RNA. *Dev Biol* 15:575-598. doi: 10.1016/0012-1606(67)90054-1
- Guzmán-Moreno J, Flores-Martínez A, Brieba LG, Herrera-Estrella A (2014) The *Trichoderma reesei* Cry1 protein is a member of the cryptochrome/photolyase family with 6-4 photoproduct repair activity. *PLoS One* 9:1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0100625
- Gyula P, Schäfer E, Nagy F (2003) Light perception and signalling in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 6:446-52. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00082-7
- Halaban R (1975) Glucose transport deficient mutant of *Neurospora crassa* with an unusual rhythmic growth pattern. *J Bacteriol* 121:1056-1063.
- Harding RW, Melles S (1983) Genetic analysis of phototropism of *Neurospora crassa* perithecial beaks using white collar and albino mutants. *Plant Physiol* 72:996-1000. doi: 10.1104/pp.72.4.996
- Harding RW, Turner R V (1981) Photoregulation of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Albino and White Collar Mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol* 68:745-49.
- Hatakeyama R, Nakahama T, Higuchi Y, Kitamoto K (2007) Light Represses Conidiation in Koji Mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1844-49. doi: 10.1271/bbb.60713
- Haydon MJ, Hearn TJ, Bell LJ, et al (2013) Metabolic regulation of circadian clocks. *Semin Cell Dev Biol* 24:414-421.
- He Q, Cheng P, Yang Y, et al (2002) White Collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* (80- ) 297:840-3. doi: 10.1126/science.1072795
- Herrera-Estrella A, Horwitz BA (2007) MicroReview. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol Microbiol* 64:5-15. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05632.x
- Hevia MA, Canessa P, Müller-esparza H, Larrondo LF (2015) A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when

- infecting *Arabidopsis thaliana*. PNAS 112:8744-49. doi: 10.1073/pnas.1508432112
- Hill EP (1976) Effect of light on growth and sporulation of *Aspergillus ornatus*. J Gen Microbiol 95:39-44.
- Hurley JM, Dasgupta A, Emerson JM, et al (2014) Analysis of clock-regulated genes in *Neurospora* reveals widespread posttranscriptional control of metabolic potential. Proc Natl Acad Sci 111:16995-7002. doi: 10.1073/pnas.1418963111
- Idnurm A, Heitman J (2005a) Photosensing Fungi: Phytochrome in the Spotlight. Curr Biol 15:829-832. doi: 10.1016/j.cub.2005.09.045
- Idnurm A, Heitman J (2005b) Light Controls Growth and Development via a Conserved Pathway in the Fungal Kingdom. doi: 10.1371/journal.pbio.0030095
- Idnurm A, Verma S, Corrochano LM (2010) A glimpse into the basis of vision in the kingdom Mycota. Fungal Genet Biol 47:881-92. doi: 10.1016/j.fgb.2010.04.009
- Ilmén M, Saloheimo A, Onnela M-L, Penttilä ME (1997) Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. Appl Environ Microbiol 63:1298-306.
- Irniger S, Bäumer M, Braus GH (2000) Glucose and Ras Activity Influence the Ubiquitin Ligases APC / C and SCF in *Saccharomyces cerevisiae*. Genet Soc Am 154:1509-21.
- Jekosch K, Kück U (2000) Glucose dependent transcriptional expression of the *cre1* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production. Curr Genet 37:388-95.
- Klein DA, Paschke MW (2004) Filamentous Fungi: The Indeterminate Lifestyle and Microbial Ecology. Microb Ecol 47:224-35. doi: 10.1007/s00248-003-1037-4
- Komon-Zelazowska M, Neuhof T, Dieckmann R, et al (2007) Formation of

- Atroviridin by *Hypocrea atroviridis* Is Conidiation Associated and Positively Regulated by Blue Light and the G protein GNA3. *Eukaryot Cell* 6:2332-42. doi: 10.1128/EC.00143-07
- Kredics L, Antal Z, Manczinger L, et al (2003) Influence of Environmental Parameters on *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential. *Food Technol Biotechnol* 41:37-42.
- Krystofova S, Borkovich KA (2006) The Predicted G-Protein-Coupled Receptor GPR-1 Is Required for Female Sexual Development in the Multicellular Fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 5:1503-16. doi: 10.1128/EC.00124-06
- Kubo H (2009) Isolation of *madA* homologs in *Pilobolus crystallinus*. *Mycoscience* 50:400-406. doi: 10.1007/s10267-009-0496-y
- Kubo H, Mihara H (1986) Effects of light and temperature on sporangiophore initiation in *Pilobolus crystallinus* (Wiggers) Tode. *Planta* 168:337-339. doi: 10.1007/BF00392358
- Kubo H, Mihara H (1988) Phototropic fluence-response curves for *Pilobolus crystallinus* sporangiophore. *Planta* 174:174-179.
- Küçük Ç, Kivanç M (2003) Isolation of *Trichoderma* Spp . and Determination of Their Antifungal , Biochemical and Physiological Features. *Turkish J Biol* 27:247-53.
- Kudla B, Caddick MX, Langdon T, et al (1990) The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J* 9:1355-64.
- Kwon N-J, Garzia A, Espeso E a, et al (2010) *FibC* is a putative nuclear C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 77:1203-19. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07282.x
- Langmead B, Pop M, Irizarry RA, Salzberg SL (2011) Bowtie2: Extending Burrows-Wheeler-based read alignment to longer reads and gapped

alignments. 21205.

- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:1-10. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25
- Lee K, Ebbole DJ (1998) Tissue-specific repression of starvation and stress responses of the *Neurospora crassa* con-10 gene is mediated by RCO1. *Fungal Genet Biol* 23:269-78. doi: 10.1006/fgbi.1998.1044
- Lee K, Singh P, Chung W, et al (2006) Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* 43:694-706. doi: 10.1016/j.fgb.2006.04.005
- Li L, Qu Q, Tian B, Zhang KQ (2005) Induction of Chlamydospores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by Antifungal Compounds Produced by *Bacillus subtilis* C2. *J Phytopathol* 153:686-93.
- Li L, Wright SJ, Krystofova S, et al (2007) Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous. *Annu Rev Microbiol* 61:423-52. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093432
- Lombardi LM, Brody S (2005) Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Clock gene homologues in fungi. *Fungal Genet Biol* 42:887-92. doi: 10.1016/j.fgb.2005.06.005
- Mach RL, Schindler M, Kubicek CP (1994) Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet* 25:567-70.
- Mogensen J, Nielsen BH, Hofmann G, Nielsen J (2006) Transcription analysis using high-density micro-arrays of *Aspergillus nidulans* wild-type and creA mutant during growth on glucose or ethanol. *Fungal Genet Biol* 43:593-603. doi: 10.1016/j.fgb.2006.03.003
- Møller IM (2001) PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu Rev Plant Mol Biol* 52:561-91.

- Mooney JL, Yager LN (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* 4:1473-1482. doi: 10.1101/gad.4.9.1473
- Moye-rowley WS (2003) MINIREVIEWS Regulation of the Transcriptional Response to Oxidative Stress in Fungi: Similarities and Differences. *Eukaryot Cell* 2:381-89. doi: 10.1128/EC.2.3.381
- Mukherjee PK, Kenerley CM (2010) Regulation of Morphogenesis and Biocontrol Properties in *Trichoderma virens* by a VELVET Protein , Vel1 Regulation of Morphogenesis and Biocontrol Properties in *Trichoderma virens* by a VELVET Protein , Vel1. *Appl Environ Microbiol* 76:2345-52. doi: 10.1128/AEM.02391-09
- Muthumeenakshi S, Sreenivasaprasad S, Rogers CW, et al (2007) Analysis of cDNA transcripts from *Coniothyrium minitans* reveals a diverse array of genes involved in key processes during sclerotial mycoparasitism. *Fungal Genet Biol* 44:1262-84. doi: 10.1016/j.fgb.2007.07.011
- Nakari-Setälä T, Paloheimo M, Kallio J, et al (2009) Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Appl Environ Microbiol* 75:4853-60. doi: 10.1128/AEM.00282-09
- Nambudiri a M, Vance CP, Towers GH (1973) Effect of light on enzymes of phenylpropanoid metabolism and hispidin biosynthesis in *Polyporus hispidus*. *Biochem J* 134:891-7. doi: 10.1042/bj1340891
- Nsa IY, Karunarathna N, Liu X, et al (2014) A Novel Cryptochrome-Dependent Oscillator in *Neurospora crassa*. *Genetics* 199:233-45.
- Paré A, Kim M, Juarez MT, et al (2012) The Functions of Grainy Head-Like Proteins in Animals and Fungi and the Evolution of Apical Extracellular Barriers. *PLoS One* 7:e36254. doi: 10.1371/journal.pone.0036254
- Penttilä ME, Nevalainen H, Rättö M, et al (1987) A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61:155-64.

- Perkins JH, Gordon SA (1969) II . Effects of Monochromatic Light '. 1712-1716.
- Purschwitz J, Müller S, Fischer R (2009) Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics* 281:35-42. doi: 10.1007/s00438-008-0390-x
- Purschwitz J, Müller S, Kastner C, et al (2008) Functional and Physical Interaction of Blue- and Red-Light Sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 18:255-59. doi: 10.1016/j.cub.2008.01.061
- Ram S, Nair BG, Chhatpar HS (1984) Photoregulation of some enzymes from *Neurospora crassa*. *Experientia* 40:1382-84. doi: 10.1128/EC.00081-13
- Reader U, Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letts Appl Microbiol* 1:17-20.
- Robertson JB, Davis CR, Johnson CH (2013) Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. *Proc Natl Acad Sci* 110:21130-35. doi: 10.1073/pnas.1313369110
- Robinson M, McCarthy D, Chen Y, et al (2012) edgeR : differential expression analysis of digital gene expression data. 2012.
- Rodríguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, et al (2010) Fungi , Hidden in Soil or Up in the Air : Light Makes a Difference. *Annu Rev Microbiol* 64:585-610. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134000
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002) Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2:183-201.
- Rosales-Saavedra T, Esquivel-Naranjo EU, Casas-Flores S, et al (2006) Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* 152:3305-17. doi: 10.1099/mic.0.29000-0
- Rua J, Rodríguez-Aparicio LB, Busto F, Soler J (1987) Effect of light on several metabolites of carbohydrate metabolism in *Phycomyces*. *J Bacteriol* 169:904-07.
- Ruger-Herreros C, Rodríguez-Romero J, Fernández-Barranco R, et al (2011)

- Regulation of Conidiation by Light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188:809-22. doi: 10.1534/genetics.111.130096
- Ruiz-González MX, Marín I (2004) New insights into the evolutionary history of type 1 rhodopsins. *J Mol Evol* 58:348-58. doi: 10.1007/s00239-003-2557-8
- Saloheimo A, Aro N, Ilmén M, Penttilä ME (2000) Isolation of the *ace1* Gene Encoding a Cys2-His2 Transcription Factor Involved in Regulation of Activity of the Cellulase Promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 275:5817-25.
- Sambrook, J; Frisch EFMT (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. En: Cold Spring Harbour.
- Sancar A, Sancar GB (1988) DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 57:29-67.
- Sancar C, Sancar G, Ha N, et al (2015) Dawn- and dusk-phased circadian transcription rhythms coordinate anabolic and catabolic functions in *Neurospora*. *BMC Biol* 13:17. doi: 10.1186/s12915-015-0126-4
- Santangelo GM (2006) Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae* Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:253-82. doi: 10.1128/MMBR.70.1.253
- Sanz C, Rodríguez-Romero J, Idnurm A, et al (2009) *Phycomyces* MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proc Natl Acad Sci* 106:7095-100. doi: 10.1073/pnas.0900879106
- Schafmeier T, Diernfellner ACR (2011) Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Lett* 585:1467-73. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.050
- Schmoll M, Esquivel-naranjo EU, Herrera-estrella A (2010) *Trichoderma* in the light of day – Physiology and development. *FUNGAL Genet Biol*. doi: 10.1016/j.fgb.2010.04.010
- Schmoll M, Franchi L, Kubicek CP (2005) Envoy , a PAS / LOV Domain Protein

- of *Hypocrea jecorina* ( Anamorph *Trichoderma reesei* ), Modulates Cellulase Gene Transcription in Response to Light. *Eukaryot Cell* 4:1998-2007. doi: 10.1128/EC.4.12.1998
- Schumacher J, Simon A, Cohrs KC, et al (2014) The Transcription Factor BcLTF1 Regulates Virulence and Light Responses in the Necrotrophic Plant Pathogen *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* 10:e1004040. doi: 10.1371/journal.pgen.1004040
- Schuster A, Schmoll M (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:787-99. doi: 10.1007/s00253-010-2632-1
- Selitrennikoff CP, Nelson RE, Siegel RW (1974) PHASE-SPECIFIC GENES FOR MACROCONIDIATION IN *NEUROSPORA CRASSA*. *Genetics* 78:679-90.
- Sharma AK, Spudich JL, Doolittle WF (2006) Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol* 14:463-69. doi: 10.1016/j.tim.2006.09.006
- Silva F, Torres-Martínez S, Garre V (2006) Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol* 61:1023-1037. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05291.x
- Simkovič M, Ditte P, Kurucova A, Lakatos B (2008) Ca<sup>2+</sup>-dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride* ~ imkovic. *Can J Microbiol* 298:291-298. doi: 10.1139/W08-001
- Sineshchekov OA, Jung K, Spudich JL (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. 99:8689-8694.
- Slattery MG, Liko D, Heideman W (2006) The Function and Properties of the Azf1 Transcriptional Regulator Change with Growth Conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 5:313-20. doi: 10.1128/EC.5.2.313
- Smith KM, Sancar G, Dekhang R, et al (2010) Transcription Factors in Light and Circadian Clock Signaling Networks Revealed by Genomewide

- Mapping of Direct Targets for Neurospora White Collar Complex. *Eukaryot Cell* 9:1549-56. doi: 10.1128/EC.00154-10
- Spudich JL, Yang C-S, Jung K-H, Spudich EN (2000) Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:365-392. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.365
- Sulová Z, Hrmová M, Farkaš V (1990) Photostimulated oxygen uptake in *Trichoderma viride*. *J Gen Microbiol* 136:2287-90.
- Thewes S (2014) Calcineurin-Crz1 Signaling in Lower Eukaryotes. *Eukaryot Cell* 13:694-705. doi: 10.1128/EC.00038-14
- Tisch D, Kubicek CP, Schmoll M (2011) New insights into the mechanism of light modulated signaling by heterotrimeric G-proteins : ENVOY acts on *gna1* and *gna3* and adjusts cAMP levels in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina* ). *Fungal Genet Biol* 48:631-40. doi: 10.1016/j.fgb.2010.12.009
- Tisch D, Schmoll M (2009) Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1259-77. doi: 10.1007/s00253-009-2320-1
- Wang Z, Li N, Li J, et al (2016) The Fast-Evolving *phy-2* Gene Modulates Sexual Development in Response to Light in the Model Fungus *Neurospora crassa*. *MBio* 7:e02148-15-. doi: 10.1128/mBio.02148-15
- Waschuk SA, Bezerra AG, Shi L, Brown LS (2005) Leptosphaeria rhodopsin : Bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Proc Natl Acad Sci* 102:6879-6883.
- Wijnen H, Young MW (2006) Interplay of Circadian Clocks and Metabolic Rhythms. *Annu Rev Genet* 40:409-48. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090603
- Wilson RA, Arst HN (1998) Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the «streetwise» GATA family of transcription factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:586-96.

- Wu C, Yang F, Smith KM, et al (2014) Genome-Wide Characterization of Light-Regulated Genes in *Neurospora crassa*. *Genes Genomes Genet* 4:1731-45. doi: 10.1534/g3.114.012617
- Yoshida Y, Hasunuma K (2004) Reactive Oxygen Species Affect Photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 279:6986-93. doi: 10.1074/jbc.M310060200
- Yu J-H, Hamari Z, Han K-H, et al (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 41:973-81. doi: 10.1016/j.fgb.2004.08.001