



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO
LABORATORIO NACIONAL DE GENOMICA PARA LA
BIODIVERSIDAD

**“Análisis funcional de los genes criptocromo/fotoliasa
de *Trichoderma atroviride*”**

Tesis que presenta

M. C. Mónica García Esquivel.

Para obtener el grado de

Doctora en ciencias

En la especialidad de

Biotecnología de plantas

Director de tesis:

Dr. Alfredo H. Herrera Estrella.

Irapuato, Guanajuato

Marzo, 2019.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca y extensión de la misma, otorgada durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Alfredo H. Herrera Estrella por aceptarme en su laboratorio.

A los doctores José Ruiz Herrera y Luis González de la Vara por sus críticas y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. June Simpson y al Dr. Mario Pedraza por aceptar ser parte de mi comité de evaluación.

Al Dr. Ulises Esquivel Naranjo por su apoyo y asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

Al Ing. Pedro Martínez por su apoyo durante mi estadía en el Laboratorio de Expresión Génica de Hongos.

A todo el equipo del Laboratorio de Expresión Génica de Hongos por sus críticas y sugerencias al proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, Yolanda Esquivel Naranjo y Luis García Martínez, y a mis hermanos Nidia, Jorge, Lupita y Rafael por su incondicional apoyo a lo largo de mi vida.

A mi pequeña gran familia Julieta Ortíz García y Javier Ortíz, por su paciencia y apoyo durante la escritura de ésta tesis, por creer en mí y alentarme a continuar.

A los amigos que encontré durante mi estancia en CINVESTAV IRAPUATO con los cuales compartí gratos momentos.

INDICE GENERAL

| | Pag. |
|---|-------------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 3.1 La luz y los seres vivos..... | 3 |
| 3.2 Los sistemas de percepción de luz en los organismos..... | 3 |
| 3.2.1 Fotorreceptores de luz azul: criptocromo/fotoliasa..... | 8 |
| 3.3 Dispersión de <i>Trichoderma atroviride</i> en su ambiente..... | 12 |
| 3.3.1 Respuestas de <i>T. atroviride</i> a la luz..... | 13 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 15 |
| 5. HIPÓTESIS | 15 |
| 6. OBJETIVOS | 16 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| 7.1 Cepas y condiciones de crecimiento..... | 17 |
| 7.2 Remoción de genes mediante PCR de doble unión..... | 17 |
| 7.3 Transformación de protoplastos de <i>T. atroviride</i> | 18 |
| 7.4 Extracción de ácidos nucleicos e hibridaciones tipo Southern y Northern blot..... | 19 |
| 7.5 Identificación de transformantes por PCR..... | 19 |
| 7.6 Ensayos de inducción con luz..... | 20 |
| 7.7 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR)..... | 20 |
| 7.8 Análisis de fotoconidiación..... | 21 |
| 7.9 Análisis del crecimiento..... | 22 |
| 7.10 Ensayos de fotorreactivación <i>in vivo</i> en <i>T. atroviride</i> | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 7.11 Construcciones para la expresión y síntesis de las proteínas PHR1, CRY1 y CRY-DASH..... | 23 |
| 7.12 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes PHR1, CRY1 y CRY-DASH..... | 24 |
| 8. RESULTADOS..... | 26 |
| 8.1 Obtención de mutantes en potenciales fotorreceptores en <i>T. atroviride</i> | 26 |
| 8.2 Evaluación del papel de los genes <i>cry1</i> , <i>cry-DASH</i> y <i>ops</i> en la fotoconidiación y el crecimiento en <i>T. atroviride</i> | 32 |
| 8.3 Análisis de la expresión del gen <i>cry1</i> en la luz..... | 39 |
| 8.4 El gen <i>cry1</i> es necesario para la fotorreactivación <i>in vivo</i> en <i>T. atroviride</i> | 41 |
| 8.5 Análisis del papel de los genes <i>blr</i> en la fotorreactivación <i>in vivo</i> en <i>T. atroviride</i> | 45 |
| 8.6 Efecto de la luz roja o azul sobre la expresión de genes regulados por luz blanca..... | 47 |
| 8.7 Efecto de la delección de los genes <i>cry1</i> o <i>phr1</i> sobre la expresión de genes independientes de <i>blr1</i> bajo condiciones de inducción con luz roja o azul..... | 50 |
| 9. DISCUSIÓN..... | 54 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 64 |
| 11. PERSPECTIVAS..... | 65 |
| 12. BIBLIOGRAFIA..... | 66 |
| 13. ANEXOS..... | 75 |
| Anexo 1. Oligonucleótidos usados en este trabajo..... | 75 |
| Anexo 2. The <i>Trichoderma atroviride</i> cryptochrome/photolyase genes regulate the expression of <i>blr1</i> -independent genes both in red and blue light..... | 79 |

INDICE DE FIGURAS

| | Pag. |
|---|------|
| Figura 1. Identificación de las mutantes $\Delta cry1$ mediante PCR y Southern blot..... | 28 |
| Figura 2. Identificación de las mutantes $\Delta cry-DASH$ mediante PCR y Southern blot..... | 30 |
| Figura 3. Identificación de las mutantes Δops mediante PCR..... | 32 |
| Figura 4. Efecto de la eliminación de los genes <i>cry1</i> y <i>cry-DASH</i> en la fotoconidiación y el crecimiento micelial en <i>T. atroviride</i> | 34 |
| Figura 5. Análisis del efecto de la eliminación del gen <i>ops</i> en la fotoconidiación en <i>T. atroviride</i> | 36 |
| Figura 6. Análisis del crecimiento micelial en cepas Δops en <i>T. atroviride</i> | 38 |
| Figura 7. Análisis de la expresión de los genes criptocromo/fotoliasa de <i>T. atroviride</i> en luz..... | 40 |
| Figura 8. Ensayo de fotorreactivación <i>in vivo</i> en <i>T. atroviride</i> | 42 |
| Figura 9. Construcciones para la expresión heteróloga y síntesis de las proteínas criptocromo/fotoliasa..... | 44 |
| Figura 10. Análisis de la expresión y producción heteróloga de las proteínas criptocromo/fotoliasa en BL21 star y purificación de PHR1..... | 45 |
| Figura 11. Los genes <i>blr1</i> y <i>blr2</i> son necesarios para la fotorreactivación <i>in vivo</i> en <i>T. atroviride</i> | 47 |
| Figura 12. Efecto de la luz roja y azul sobre la expresión de genes independientes de <i>blr1</i> | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Efecto de la luz roja o azul sobre la acumulación de transcritos en mutantes de potenciales receptores de luz azul..... | 52 |
| Figura 14. Modelo hipotético para la regulación de la expresión génica en la luz roja en <i>T. atroviride</i> | 60 |
| Figura 15. Modelo hipotético para la regulación de la expresión génica en la luz azul en <i>T. atroviride</i> | 62 |

INDICE DE TABLAS

| | Pag. |
|--|------|
| Tabla1. Crecimiento total de las cepas silvestre, $\Delta cry1$ o $\Delta cry-DASH$ en la oscuridad o en luz azul constante..... | 35 |

1. RESUMEN.

Trichoderma atroviride es usado como agente de control biológico en el combate de hongos fitopatógenos. El medio de propagación de este hongo son los conidios (estructuras de reproducción asexual) los cuales se utilizan en campo para efectos del control biológico. Entre los diversos factores que inducen la conidiación se encuentra la luz (blanca o azul). En *T. atroviride* la luz también regula el crecimiento micelial y la expresión de genes. Estos procesos son regulados principalmente a través del fotorreceptor de luz azul conformado por las proteínas BLR1 y BLR2; sin embargo, existen evidencias que sugieren la participación de otro u otros fotorreceptores en la regulación de dichos procesos. Aquí se evaluaron potenciales receptores de luz azul pertenecientes a la familia criptocromo/fotoliasa así como un potencial receptor de luz verde de tipo opsina. Para ello, se generaron las mutantes en los genes *cry1*, *cry-DASH* y *ops*, y se evaluaron las principales respuestas a la luz como son crecimiento, conidiación y expresión génica. Previamente en nuestro laboratorio se realizó un análisis de secuenciación masiva mediante pirosecuenciación 454 lo que permitió identificar un conjunto de genes regulados por luz blanca de manera independiente del fotorreceptor de luz azul Blr1. Con el objetivo de analizar la participación de otros fotorreceptores, se analizó la expresión génica en respuesta a diferentes longitudes de onda. La regulación génica por luz roja y azul sugiere el involucramiento de varios fotorreceptores en la integración de la señal de luz de diferentes longitudes de onda en *T. atroviride*. El análisis funcional de potenciales receptores de luz azul nos condujo a la identificación de una respuesta cooperativa entre sistemas de percepción para diferentes longitudes de onda en *T. atroviride*, indicando que *Cry1* participa de manera importante en la regulación de la expresión génica tanto bajo luz roja como luz azul. Adicionalmente, mediante ensayos de fotorreactivación se demostró que la eliminación de *cry1*, uno de los potenciales fotorreceptores, resulta en una reducción en la capacidad de fotorreactivación del hongo. Estos resultados indican que

Cry1 tiene una función dual, como fotoliasa y como regulador de la expresión génica.

2. ABSTRACT.

Trichoderma atroviride is used as a biological control agent to combat phytopathogenic fungi. Conidia (asexual reproduction structures) are the means of dispersal of this fungus, and these are used in the field for biological control. Among the various factors that induce conidiation is light (blue or white light). In *T. atroviride*, light also regulates mycelial growth and gene expression. These processes are regulated mainly through the action of the blue light photoreceptor composed of BLR1 and BLR2 proteins. However, there is evidence suggesting the involvement of other photoreceptors in the regulation of these processes. Here I evaluated potential blue light receptors belonging to the cryptochrome/photolyase family, and the potential green light receptor opsin. For this purpose I generated mutants lacking in the *cry1*, *cry-DASH* and *ops* genes. The main responses to light which were evaluated were growth, conidiation and gene expression. Previously, in our laboratory a quantitative transcriptome analysis had led to the identification of a set of *blr1* independent genes regulated by white light. In order to analyze the involvement of other photoreceptors in the regulation of these genes, I validated gene expression in response to different wavelengths. Gene regulation by blue and red light suggests the involvement of several photoreceptors in integrating light signals of different wavelengths in *T. atroviride*. Functional analysis of potential blue light receptors led us to the identification of a cooperative response between perception systems for different wavelengths in *T. atroviride*. Deletion of *cry1*, one of the potential photoreceptors, resulted in severe reduction in the photoreactivation capacity of the fungus, as well as a change in gene expression under blue and red light. These results indicate that Cry plays a dual role, as a DNA photolyase and as a regulator of gene expression.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1 La luz y los seres vivos.

La capacidad para responder adecuadamente a las señales ambientales es de vital importancia para los organismos; por ello no es de sorprender que estos hayan desarrollado una variedad de sistemas que les permiten percibir y responder a diferentes estímulos. La interacción y convergencia entre rutas involucradas en la percepción y transducción de un estímulo percibido es un aspecto ampliamente observado y que sirve para la integración de la información ambiental que el organismo adquiere del entorno en que se desarrolla, permitiéndole una respuesta rápida y eficiente.

La luz solar es un factor ambiental importante que regula diversos procesos fisiológicos en los organismos; ésta es percibida por fotorreceptores, los cuales consisten de una proteína con uno o varios cromóforos unidos a ella. La señal luminosa es percibida por el cromóforo, resultando en cambios conformacionales del fotorreceptor, que inician una cascada de transducción de la señal que conduce a la respuesta celular del organismo (Schwerdtfeger y col., 2003; Fraikin y col., 2013).

La luz puede tener efectos tanto positivos como negativos ya que por un lado les permite a los organismos obtener información de su ambiente a fin de adaptarse y asegurar su sobrevivencia pero, por otro lado a longitudes de onda corta (azul/UV) la luz puede generar efectos negativos sobre componentes celulares importantes como el DNA. Por ello, los organismos han desarrollado tanto un variado conjunto de fotorreceptores que les permiten percibir y adaptarse a su ambiente, así como sistemas que les permiten contrarrestar los efectos genotóxicos de la radiación UV.

3.2 Los sistemas de percepción de luz en los organismos.

La visión es el sentido que permite a los animales interpretar su entorno a partir de la luz que reflejan las superficies que lo componen. El ojo humano es un órgano extraordinariamente complejo que convierte los fotones

luminosos en impulsos nerviosos, que viajan hasta el cerebro y dan lugar a la visión. El pigmento fotorreceptor presente en las células sensoriales del ojo (conos y bastones) se llama rodopsina. Este se forma por la unión de la proteína opsina y un aldehído, el retinal. Las opsinas constituyen un conjunto de proteínas fotoactivas de membrana con varias características en común. Todas ellas tienen siete hélices transmembranales y unen el cromóforo retinal covalentemente a través de un enlace base de schiff con un residuo de lisina ubicado en la séptima hélice. Hay dos grupos principales de opsinas, el primer grupo conocido como opsinas tipo II presente solo en eucariotas superiores, específicamente en el reino animal, funcionan como fotorreceptores acoplados a proteínas G, llamados pigmentos visuales de eucariotas superiores y unen 11-cis-retinal como cromóforo. El segundo grupo llamado opsinas microbianas u opsinas tipo I han sido identificadas en Arqueas, Bacterias y eucariotas inferiores, estas funcionan como proteínas sensoriales o de transporte. Las opsinas tipo I unen todo-trans-retinal como cromóforo (Brown, 2004; Zhang y col., 2011). En los hongos se han identificado genes que codifican opsinas, con base en su similitud de secuencia se distinguen tres clases de opsinas fúngicas: 1) un grupo con similitud a la opsina de *Leptosphaeria* la cual funciona como bomba de protones activada por luz, 2) un grupo con similitud a la opsina de *Neurospora* la cual se sugiere tiene funciones sensoriales y 3) un grupo llamado ORP por sus siglas en inglés opsin-related proteins, a diferencia de los otros grupos estas proteínas carecen del residuo de lisina conservado necesario para la unión del retinal (Brown, 2004; García-Martínez y col., 2015; Rodríguez-Romero y col., 2010). Existen pocos reportes sobre el análisis funcional de las opsinas en hongos y en la mayoría de los casos no se han observados fenotipos obvios tras la delección de los respectivos genes por lo que su papel en la fotobiología de los hongos no ha sido claramente dilucidado (Ildnum y col., 2010; Rodríguez-Romero y col., 2010). En *N. crassa*, la expresión del gen de opsina (*nop-1*) es regulado por la luz y la proteína NOP-1 expresada heterológicamente en *Pichia pastoris* une todo-trans retinal y es capaz de absorber luz verde ($\lambda_{\text{máx}} 534\text{nm}$), apoyando la hipótesis de

que NOP-1 juega un papel en la fotobiología de este hongo. Sin embargo, la delección del gen *nop-1* no mostró ningún fenotipo aparente en las respuestas a luz bajo condiciones estándar de laboratorio, aunque sí se observó un efecto sobre la conidiación dependiente de luz en presencia de oligomicina. Se sugiere que, dicho efecto pudo resultar de una compensación por la H⁺-ATPasa mitocondrial de una función en la conidiación regulada por luz de NOP-1 en las mutantes $\Delta nop1$. Alternativamente el fenotipo observado, pudo ser resultado de un efecto indirecto de la oligomicina, por ejemplo, una reducción en los niveles de ATP (Bieszke y col., 1999). El análisis de expresión de los genes específicos de conidiación y/o regulados por luz: *al-2*, *con-10* y *con-13* en una mutante *nop-1* sugiere que NOP-1 es un regulador negativo de los genes de conidiación *con-10* y *con-13*. Además el análisis de expresión del gen *nop-1* en mutantes *wc-1* y *wc-2* sugiere que WC-2 regula negativamente su expresión independientemente de la luz (Bieszke y Li, 2007).

La luz es crucial para la conversión fotosintética de la energía solar en energía química en las plantas, algas y diversas bacterias. Sin embargo, estos organismos no solo usan la luz solar como una fuente de energía para la fotosíntesis, también la usan como una fuente de información para controlar un amplio rango de respuestas fisiológicas y de desarrollo durante su ciclo de vida, por ello no es sorprendente que, por ejemplo, las plantas hayan desarrollado un variado conjunto de sistemas fotorreceptores que les permiten responder a un amplio rango de longitudes de onda de luz, que va desde el ultravioleta B (UV-B) hasta el rojo lejano (Kong y Okajima, 2016). Entre los procesos regulados por la luz en las plantas se encuentran: la germinación, expansión de hojas, crecimiento del tallo, fototropismo, apertura de estomas, inicio de la floración y relocalización de los cloroplastos (Wang, 2005; Kong y Okajima, 2016). La mayoría de los procesos regulados por la luz en las plantas depende de las regiones del espectro correspondientes a la luz azul, roja y roja lejana. Entre los sistemas fotosensoriales regulatorios conocidos, el sistema fotorreceptor de las plantas es considerado el más complejo. Este incluye cinco de los tipos

básicos más abundantes de fotosensores: fitocromos que perciben luz roja/roja-lejana (600-750 nm), criptocromos, fototropinas y proteínas caja-F ZTL/FKF1/LKP2 (Zeitlupe/Flavin-binding Kelch repeat F-box 1/LOV kelch protein 2) que perciben luz azul/UVA (320-500 nm) así como la proteína UVR8 que percibe UVB (290-320 nm). Estas proteínas funcionalmente interconectadas inducen los programas de desarrollo en plantas y coordinan los ritmos circadianos de sus funciones fisiológicas con el ciclo solar (Fraikin y col., 2013; Kong y Okajima, 2016). Las fototropinas median respuestas celulares como el fototropismo, apertura de estomas y relocalización de cloroplastos. Los criptocromos y fitocromos tienen papeles redundantes y únicos mediando varias respuestas fotomorfogénicas que incluyen el alargamiento del hipocotilo, expansión de cotiledones, tiempo de floración y regulación de la expresión de genes por ejemplo: *cop1*, *obp3* y *hy5*. Anteriormente se consideraba que los fitocromos solo existían en las plantas; sin embargo, diversos estudios han dejado clara su existencia tanto en organismos fotosintéticos como en no fotosintéticos. En los hongos los fitocromos han sido identificados en los genomas de varias especies, pero solo en algunas de ellas se ha analizado en detalle su función (Casas-Flores y Herrera-Estrella, 2016; Yu y col., 2018). En *N. crassa*, se identificaron dos genes que codifican fitocromos, *phy-1* y *phy-2*. Inicialmente en un estudio sobre la función de los genes *phy*, la delección de estos genes no detectó alteración alguna de las fotorespuestas conocidas en dicho hongo (Froehlich y col., 2005). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que *phy2* modula el desarrollo sexual en respuesta a luz en *N. crassa* (Wang y col., 2016). En *Beauveria bassiana*, un hongo patógeno de insectos, su único fitocromo (*Bbphy*) regula la conidiación en luz roja/roja lejana y la tolerancia a varias clases de estrés (Qui y col., 2014). En *Aspergillus nidulans* la delección del gen *fphA*, que codifica el fitocromo FphA, reprime el desarrollo sexual y la producción de micotoxinas. Se ha demostrado que FphA es parte de un complejo proteico que también contiene a los sensores de luz azul LreA y LreB, homólogos de *White-Collar-1* (WC-1) y *White-Collar-2* (WC-2) respectivamente de *N. crassa* (Purschwitz y col., 2008).

En organismos no fotosintéticos, tales como los hongos, la luz también regula diversos procesos fisiológicos como la reproducción sexual y asexual, fototropismo, ritmos circadianos, metabolismo secundario y virulencia en especies patogénicas, y expresión de genes (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007; Idnurm *et al.* 2010). Por lo tanto, no es de sorprender que aquellos sean capaces de percibir la luz sobre un amplio rango del espectro, desde el ultravioleta hasta el rojo lejano (Purschwitz y col., 2006, Rodríguez-Romero y col., 2010; Corrochano y Garre, 2010). En los hongos, el primer fotorreceptor identificado fue WC-1, en *N. crassa* (Ballario y col., 1996). En este hongo todas las respuestas a la luz conocidas son reguladas por luz azul. Otra proteína involucrada en la señalización de luz azul en *N. crassa* es WC-2 (Linden y Macino, 1997). Las proteínas WC-1 y 2 poseen dominios PAS (PER, proteína circadiana *period*; ARNT, translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo; SIM, proteína *single-minded*) y dominios de unión a DNA tipo GATA (GATA: secuencia nucleotídica a la que específicamente se unen los factores de transcripción con este tipo de dominios). Mientras WC-1 presenta 3 dominios PAS, WC-2 presenta solo uno. En WC-1 el dominio más próximo al extremo N-terminal es un dominio PAS/LOV capaz de unir una molécula de flavina permitiéndole funcionar como fotorreceptor de luz azul. WC-1 y WC-2 interactúan mediante el tercer dominio PAS de WC-1 (dominio PAS más próximo al C-terminal) y el dominio PAS de WC-2, formando un complejo que actúa como un activador transcripcional de genes regulados por luz azul. Los ortólogos de *wc1* y *wc2* han sido identificados en todo el reino de los hongos (Purschwitz y col., 2006, Idnurm y col., 2010; Rodríguez-Romero y col., 2010). En *T. atroviride* los ortólogos de *wc-1* y *wc-2*, *blr1* y *blr2* respectivamente, son esenciales para la fotoconidiación, así como para la expresión de genes regulados por luz azul (Casas Flores y col., 2004; Rosales-Saavedra y col., 2006). Como ocurre en las proteínas WC, las proteínas BLR presentan dominios de unión a DNA tipo GATA y dominios PAS. La proteína BLR1 presenta 3 dominios PAS, el primero de ellos es un dominio tipo LOV y en dicho dominio se encuentran presentes los aminoácidos necesarios para la unión de flavina, sugiriendo que BLR1 es el fotorreceptor de luz azul. BLR2

solo presenta un dominio PAS, siendo probable que a través de estos dominios ocurra una interacción entre las proteínas BLR, de manera similar a como ocurre con las proteínas WC y como tal participen en la transcripción de genes regulados por la luz azul (Casas Flores y col., 2004; Rosales-Saavedra y col., 2006).

3.2.1 Fotorreceptores de luz azul: criptocromos/fotoliasas.

La disponibilidad de los genomas de diversos organismos, de herramientas genéticas, bioquímicas, y bioinformáticas ha permitido la identificación de varias clases de fotorreceptores evolutivamente conservados a través de los diferentes reinos de los organismos vivos. En bacterias, hongos, plantas y animales, se han identificado varias clases de fotorreceptores de luz azul. Estos incluyen, proteínas con dominios BLUF (Blue Light sensing Using FAD), AppA (regulador de la expresión de genes de fotosíntesis en *Rhodobacter sphaeroides*), PAC (Phoactivated Adenylyl Cyclase), Blf1; proteínas con dominios PAS WC-1, VIVID (VVD fotorreceptor de luz azul en *N. crassa*), fototropinas; Xantopsinas y proteínas de la familia criptocromo/fotoliasa (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007; van der Horst y col., 2004; Brych y col., 2015; Casas-Flores y Herrera-Estrella, 2016; Yu y col., 2018). Algunos fotorreceptores tienen un papel muy conservado en todos los organismos, implicando una convergencia evolutiva de sus funciones. Este es el caso de los criptocromos, los cuales tienen un papel universal en el control de procesos circadianos ya sea como fotorreceptores o como un componente clave del reloj biológico circadiano. Los criptocromos fueron los primeros fotorreceptores de luz azul identificados. El primer gen de criptocromo fue identificado a partir de la mutante *hy4* de *Arabidopsis thaliana*, la cual estaba afectada en la inhibición del alargamiento del hipocotilo cuando se crecía en luz azul. La caracterización de esta mutante reveló que el gen afectado en la mutante *hy4* codifica una proteína con alta similitud a DNA fotoliasas (Ahmad y col., 1993).

Los criptocromos son receptores de luz azul/UVA, los cuales probablemente evolucionaron a partir de una DNA fotoliasa ancestral, una enzima responsable de la reparación de lesiones genéticas (dímeros de pirimidinas) promovidas por la irradiación UV, sin embargo, los criptocromos (en plantas y animales) parecen carecer de actividad de reparación de DNA (Lin y Todo, 2005). Recientemente se han comenzado a identificar miembros de la familia criptocromo/fotoliasa (en hongos y algas) que presentan una función dual, tanto en reparación de DNA, como en regulación de procesos controlados por la luz. Los criptocromos y las DNA fotoliasas constituyen la familia de criptocromo/fotoliasas. De acuerdo a su similitud de secuencia, los criptocromos se dividen en criptocromos de plantas, criptocromos de animales y cry-DASH. De acuerdo al tipo de lesión revertida, las DNA fotoliasas se clasifican en i) CPD fotoliasas, capaces de operar sobre dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y, ii) 6-4 fotoliasas, enzimas que reconocen y revierten los fotoproductos 6-4 (6-4PP) (Lin y Todo, 2005). Entre los miembros de esta familia existe una región amino terminal similar a las fotoliasas de bacterias (Phr), esta región es altamente conservada y comprende aproximadamente los primeros 500 aminoácidos de la proteína. En esta región se unen dos cromóforos que le permiten absorber luz azul/UV-A, el FAD que cumple la función de cromóforo catalítico y una molécula de 8-hidroxi-5-deazaflavina (8-HDF) o 5,10-meteniltetrahidrofolato (MTHF) que cumple el papel de fotoantena, en el caso de las CPD fotoliasas. En los criptocromos se consideran que el cromóforo antena es el MTHF ya que hasta ahora solo el MTHF ha podido ser encontrado en varios casos. Sin embargo, recientemente en el hongo *N. crassa* se demostró que la proteína CRY-DASH purificada unía los cromóforos FAD y MTHF (Froelich y col., 2010). Los criptocromos presentan una extensión carboxilo terminal de tamaño y composición de aminoácidos variable siendo más larga en los criptocromos de plantas que en los de animales; además no se unen a DNA (Lin y Todo, 2005). Esta extensión carboxilo terminal es relevante para las interacciones proteína-proteína y consecuentemente en la transducción de la señal de luz azul percibida. En las plantas los criptocromos regulan procesos de

fotomorfogénesis y son componentes centrales del reloj circadiano (Lin y Todo, 2005). Inicialmente se pensaba que los criptocromos solo se encontraban en eucariotas superiores; sin embargo, la identificación de un gen de criptocromo en la cianobacteria *Synechocystis* (Hitomi y col., 2000) puso de manifiesto la existencia de los criptocromos en organismos procariotas. Esta nueva clase de criptocromos fue llamada CRY-DASH (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Human*) (Brudler y col., 2003). Estas proteínas se han identificado ya en un gran número de organismos y se ha propuesto que se unen a DNA y fotorreparan dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) en el DNA de cadena sencilla (Selby y col., 2006). Los otros miembros de la familia de criptocromo/fotoliasas son las 6-4 fotoliasas y las CPD fotoliasas, las cuales reparan el daño en el DNA ocasionado por radiación UV en un proceso dependiente de luz llamado fotorreactivación. Con base en relaciones filogenéticas entre las fotoliasas y los criptocromos, y en que la separación de la función de fotorreparación y la de fotopercepción se dió tempranamente en la evolución, se ha propuesto a las fotoliasas como el ancestro evolutivo de los criptocromos (Berrocal-Tito y col., 2000). Además, se ha propuesto una función alternativa para las fotoliasas a partir de la observación de que en ausencia de luz de fotorreactivación, la enzima fotoliasa es capaz de unirse al DNA dañado y estimular la remoción del daño ocasionado por UV estimulando el sistema de reparación por escisión de nucleótidos *in vivo* e *in vitro* y, por lo tanto, es capaz de contribuir a la defensa celular contra el daño al DNA aún en la ausencia de luz (Sinha y Häder, 2002). En varios hongos filamentosos se han identificado miembros de la familia criptocromo/fotoliasa, *phr1* (CPD fotoliasa) en *T. atroviride* (Berrocal-Tito y col., 2007), *cryA* (CPD fotoliasa) en *A. nidulans* (Bayram y col., 2008) y *phl1* (6-4 fotoliasa) en *Cercospora zeae-maydis* (Bluhm y col., 2008); las cuales poseen actividad de fotoliasa o son relevantes para la fotorreactivación, además de cumplir funciones asociadas a procesos sensoriales. En *T. atroviride* se sugiere que Phr1 podría interactuar con las proteínas BLR para regular su propia expresión y la de genes regulados por la luz. La proteína Phr1 presenta una extensión en su

extremo amino terminal adicional a su dominio conservado de la familia de criptocromo/fotoliasas, y se postula que podría tener una función similar a las extensiones presentes en los criptocromos de plantas y animales (Berrocal-Tito y col., 2007). En *A. nidulans*, el gen *cryA* codifica una proteína con actividad de fotoliasa cuando se expresa en *Escherichia coli* y además presenta funciones de regulación del desarrollo sexual en una manera dependiente de luz (Bayram y col., 2008). En *C. zea-maydis* la interrupción del gen *Phl1* elimina completamente la capacidad de fotorreactivación del hongo, sugiriendo que el producto de este gen presenta funciones de DNA fotoliasa, un regulador de la actividad de esta, o ambas (Bluhm y col., 2008). Por otro lado, los miembros de la clase CRY-DASH también se han identificado en los hongos; ejemplo de ellos son: *Cry1* en *Sclerotinia sclerotiorum* (Veluchamy y col., 2008), *cry* en *N. crassa* (Froehlich y col., 2010), *CryD* en *Fusarium fujikuroi* (Castrillo y col., 2013), *cryA* en *Phycomyces blakesleanus* (Tagua y col., 2015) y *Cmcry-DASH* en *Cordyceps militaris* (Wang y col., 2017). Con excepción de *P. blakesleanus*, en ningún caso se ha establecido algún papel de las proteínas CRY-DASH en la fotorreactivación bajo las condiciones usadas. En *N. crassa* la remoción del gen *cry* dio lugar a un retraso en la conidiación cuando la cepa Δcry fue expuesta a ciclos de luz y oscuridad (Froehlich y col., 2010). En *F. fujikuroi* la remoción del gen *cryD* dio lugar a varias alteraciones fenotípicas dependientes de luz como fueron: cambios en la morfología y pigmentación de las colonias, producción de macroconidias bajo condiciones de inanición de nitrógeno e incremento en la producción de bikaverina (Castrillo y col., 2013). En *C. militaris* la remoción del gen *Cmcry-DASH* dio lugar a una reducción en la producción de conidias, un incremento en la producción de cordicepina (antibiótico que inhibe la síntesis de RNA bacteriano) y un desarrollo inadecuado de los cuerpos fructíferos, respecto a la cepa silvestre, en respuesta a luz (Wang y col., 2016). En *Sclerotinia sclerotiorum*, uno de los hongos patógenos de plantas más ubicuo se identificó un gen *Cry-DASH* (*Cry1*). El análisis de expresión de este gen mostró que es inducido específicamente por luz UV-A, y en mayor

cantidad en el tejido que constituye el cuerpo fructífero sexual de dicho hongo (apotecio), sugiriendo algún papel para Cry1 en el desarrollo de apotecios. Sin embargo, cepas deficientes en este gen, no presentaron ningún fenotipo que permitiera establecer claramente su papel (Veluchamy y col., 2008). En contraste a los resultados que se han obtenido del análisis de proteínas CRY-DASH de hongos en la fotorreactivación, en *P. blakesleanus*, el único miembro de la familia criptocromo-fotoliasa identificado, CryA (miembro del subgrupo CRY-DASH), repara el daño CPD en DNA de cadena doble o sencilla con igual eficiencia (Tagua y col., 2015). A partir de estos resultados los miembros de la familia criptocromo/fotoliasa identificados en hongos parecen tener una clara actividad de fotoliasa o ser importantes en el proceso de fotorreactivación. El establecimiento de sus funciones sensoriales no es algo trivial de determinar; probablemente la presencia de más de un miembro de esta familia con actividades redundantes impida una correcta aclaración de su función.

3.3 Dispersión de *Trichoderma atroviride* en su ambiente.

El hongo micoparasítico *T. atroviride* es reconocido por su capacidad como agente de control biológico en el combate de hongos fitopatógenos. El medio de dispersión de *T. atroviride* son los conidios (estructuras de reproducción asexual) las cuales son aplicadas en campo para el control biológico de hongos fitopatógenos y nematodos (Shoresh y col., 2010). *T. atroviride* responde a diferentes estímulos ambientales produciendo conidios las cuales le garantizan un medio de propagación y un almacén genético seguro bajo condiciones ambientales adversas.

Entre las diferentes señales que regulan la conidiación en *T. atroviride* se encuentran: la luz, el daño mecánico y la disponibilidad de nutrientes. En su hábitat natural la distribución no homogénea de los nutrientes o el agotamiento de ellos, induce la formación de estructuras que le permiten dispersarse y encontrar condiciones nutricionales adecuadas para su desarrollo. Si bien se considera que la fotoconidiación depende de la

naturaleza de la fuente de carbono disponible (Chovanec y col., 2001), recientemente se ha propuesto que este factor no es capaz de garantizar la dispersión del hongo y que es la combinación de luz y disponibilidad de fuentes de carbono lo que marca las condiciones óptimas para la inducción de un rápido crecimiento y lograr el desarrollo de conidióforos en menor tiempo para la dispersión de los conidios (Friedl y col., 2008). Por ello, los sistemas de percepción de nutrientes disponibles y los sistemas de percepción de luz, resultan vitales para la dispersión de *T. atroviride*.

3.3.1 Respuestas de *Trichoderma atroviride* a la luz.

Como ya se mencionó, en *T. atroviride*, la luz induce la reproducción asexual (conidiación), y además inhibe el crecimiento micelial y regula la expresión de genes responsivos a la luz (Casas-Flores y col., 2004; Rosales-Saavedra y col., 2006). La exposición breve de una colonia creciendo radialmente a un pulso de luz azul es suficiente para inducir la producción de un anillo de conidios en lo que constituye el perímetro de la colonia al tiempo de la exposición a la luz. Debido a esta clara respuesta a la luz *T. atroviride* ha sido usado como modelo fotomorfogenético. Hasta ahora se sabe que la fotoconidiación de *T. atroviride* es un proceso regulado por las proteínas BLR, aunque no se descarta la posibilidad de que existan otros sistemas de percepción de luz azul funcionales en este hongo. Previamente se ha demostrado que la luz tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *Trichoderma* y que tal efecto es regulado por las proteínas *blr* (Casas-Flores y col., 2004). En las cepas $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$, la luz azul tiene un efecto de inhibición del crecimiento aun mayor respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere que otro sistema de percepción de luz azul podría participar en el efecto negativo sobre el crecimiento micelial observado (Casas-Flores y col., 2004). Tras la percepción de la luz, se inicia una reprogramación de la actividad transcripcional conduciendo a la acumulación de los componentes necesarios para las respuestas a luz observadas. Previamente en nuestro laboratorio mediante un análisis de secuenciación masiva se

identificaron 328 genes regulados por luz blanca de los cuales 77 fueron regulados por luz en una manera independiente de *blr1*, sugiriendo la existencia de otro u otros sistemas de percepción de luz involucrados en la regulación de la expresión de genes responsivos a este estímulo. En ese sentido además de Blr1, en el genoma de *T. atroviride* se han identificado varios receptores de luz potenciales como son un gen de opsina, dos fitocromos, un criptocromo/6-4 fotoliasa (*cry1*) y un gen *cry-DASH* (Schmoll y col., 2010). Con el objetivo de evaluar la función de otros fotorreceptores adicionales a Blr1, se analizó la regulación por luz y el efecto de la remoción de los genes *cry1*, *cry-DASH* y *ops* sobre las principales respuestas a la luz en *T. atroviride*. Además, dado que los genes criptocromo/fotoliasa podrían funcionar en la reparación de DNA dañado, también evaluamos la participación de los genes *cry1* y *cry-DASH* en la fotorreactivación *in vivo* en *T. atroviride*.

4. JUSTIFICACIÓN.

Diversas señales ambientales inducen el proceso de conidiación en *T. atroviride*. Dado el potencial de este hongo en el control biológico y debido a que los conidios constituyen su medio de dispersión, los estudios sobre el papel de las señales ambientales en el proceso de conidiación pueden contribuir al desarrollo de tecnologías para la producción a gran escala de conidios para su uso en el biocontrol. La luz solar es un factor natural que regula el proceso de conidiación, en *T. atroviride* esta es percibida por

medio de fotorreceptores como las proteínas BLR las cuales perciben la luz azul, regulan la expresión de genes y la conidiación. Se han identificado respuestas a luz azul que son independientes de las proteínas BLR, sugiriendo la existencia de otros sistemas de percepción de la luz azul, que posiblemente estén asociados a la conidiación. Estas respuestas ofrecen una oportunidad para la identificación de otros sistemas de percepción de la luz azul en *T. atroviride*.

5. HIPOTESIS.

En *T. atroviride* existen receptores de luz azul tipo criptocromo y estos podrían participar en la regulación de las respuestas a la luz conocidas (expresión génica, crecimiento y fotoconidiación).

6. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Determinar la función de los genes criptocromo/fotoliasa y opsina de *T. atroviride*.

Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto de la remoción de los genes criptocromo/fotoliasa y opsina en las respuestas a la luz azul de *T. atroviride*.
2. Determinar si los genes criptocromo/fotoliasa son necesarios para la fotorreactivación *in vivo* en *T. atroviride*.
3. Determinar el papel de los genes criptocromo/fotoliasa y opsina en la regulación de la expresión de genes regulados por luz independientes de *blr1*.

7. MATERIALES Y METODOS.

7.1 Cepas y condiciones de crecimiento.

En el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa silvestre de *T.atroviride* IMI 206040 y las cepas mutantes $\Delta blr1$ (Casas-Flores y col., 2004), $\Delta phr1$ (Berrocal-Tito y col., 2007), Δops , $\Delta cry-DASH$ y $\Delta cry1$ (generadas en este trabajo), para su construcción, el marco de lectura abierto (ORF) de cada gen fue reemplazado por el gen *hph* (higromicina fosfotransferasa) bajo el control del promotor constitutivo del gen *trpC* de *A. nidulans*. Todas las cepas fueron crecidas sobre medio agar papa dextrosa (PDA) de DIFCO (Detroit, MI). Cada cepa fue crecida en la oscuridad por 36 h a 28°C; después de este tiempo de incubación se cortaron discos de micelio (0.5 cm de diámetro) del frente de crecimiento de la colonia y se colocaron en el centro de placas nuevas de PDA cubiertas con celofán para la inducción con luz, o sin celofán para el análisis de fotoconidiación y crecimiento.

7.2 Remoción de genes mediante PCR de doble unión.

Para la generación de las mutantes en los genes *ops*, *cry1* o *cry-DASH* se realizó un reemplazo génico de acuerdo al método descrito por Yu y col. (2004). Para ello se diseñaron oligonucleótidos que nos permitieran amplificar las regiones 5' y 3' que flanquean a cada una de las regiones codificantes de los genes mencionados en reacciones separadas (Anexo 1A). Por otro lado, se amplificó el "cassette" de resistencia a higromicina; en una segunda reacción se mezclaron en una relación molar 1:3:1 la región flanqueante 5': *hph* y la región flanqueante 3' previamente purificados mediante columnas QIAquick Spin (QIAGEN). Se realizó una segunda reacción de PCR para fusionar los fragmentos antes mencionados. Usando un par de oligonucleótidos anidados (Anexo 1A), se llevó a cabo una tercera reacción de PCR. Los productos de esta tercera amplificación se purificaron usando las columnas antes mencionadas y posteriormente se procedió a la transformación de protoplastos de *T. atroviride*.

7.3 Transformación de protoplastos de *T. atroviride*.

Se inocularon 10^{-8} conidias de *T. atroviride* IMI 206040 en 100 ml de medio de cultivo PDYEG (1.5% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura y 0.5% de hidrolizado de caseína) y se incubaron durante 18-20 h a 27°C con agitación orbital (160 rpm). El micelio fue colectado por filtración a través de un embudo con un cono de tela magitel estéril. Se lavó con 50 ml de agua destilada estéril y se recuperó con una espátula metálica estéril. El micelio (0.25-0.5 g) se colocó en un tubo Falcon de 50 ml con 7 ml de solución osmótica (CaCl_2 50 mM, manitol 0.5 M y MES 50mM, pH 5.5) con Novozima (6mg/ml). El micelio se resuspendió y se incubó a temperatura ambiente con agitación orbital (100 rpm) hasta la formación de protoplastos (aproximadamente 2 h). Los protoplastos se filtraron utilizando un sistema de dos filtros Miracloth acoplados y se lavaron con 2-4 ml de solución osmótica. Los protoplastos se colectaron por centrifugación a 5939 xg durante 10 min. Los protoplastos sedimentados se resuspendieron en un volumen de 500 μl de solución osmótica, se cuantificaron en el microscopio usando una cámara de Neubauer obteniendo una concentración total de entre 10^7 y 10^8 protoplastos. Posteriormente, se tomaron 240 μl de la suspensión de protoplastos, se mezclaron con 20 μl de DNA (10 μg) y se incubaron en hielo por 20 min. A esta mezcla, se le agregaron 260 μl de poli-etilenglicol (PEG-4000) al 40% precalentado a 42°C y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, los protoplastos se mezclaron en PDA suave (2.4% de PDB adicionado con 0.7% de agar bacteriológico, 1 M de sorbitol y 100 μg de higromicina por ml de medio) y se dispersaron en placas con medio PDA selectivo (3.9% de PDA, 0.5 M de sorbitol y 100 μg de higromicina por ml de medio). Las transformantes resistentes al antibiótico fueron cultivadas durante tres pases monospóricos bajo condiciones selectivas y finalmente, analizadas por PCR e hibridación tipo Southern blot.

7.4 Extracción de ácidos nucleicos e hibridaciones tipo Southern y Northern blot.

Las extracciones del DNA y RNA se realizaron a partir de micelio crecido sobre placas de PDA cubiertas con celofán, de acuerdo al método descrito por Raeder y Broda (1985) y Jones y col. (1985), respectivamente. Las hibridaciones tipo Southern y Northern blot se realizaron de acuerdo a protocolos convencionales (Sambrook y Russell, 2001).

7.5 Identificación de transformantes por PCR.

Para la identificación de transformantes por PCR se utilizó el DNA obtenido de micelio, el cual fue obtenido a partir de esporas provenientes del tercer pase monospórico de las cepas candidatas a mutantes en los genes *ops*, *cry1* o *cry-DASH*. En cada caso, se realizaron dos reacciones de PCR a fin de confirmar el reemplazo génico. Para las transformantes en el gen *ops* se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos: ORFOPS-F Y ORFOPS-R para la primer PCR, y pOPS-F y CRH-r para la segunda PCR; para el gen *cry1* se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos: *cry1p*-F y CRH-r para la primer PCR, y *cry1p*-F y ORF*cry1*-r para la segunda. Para las transformantes en el gen *cry-DASH* se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos: *cryDASHp*-F y CRH-r para la primer PCR y ORF*cry-DASH*-F y ORF*cry-DASH*-r para la segunda PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con Taq polimerasa recombinante (INVITROGEN) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor y usando los oligonucleótidos antes mencionados. Las secuencias de todos los oligonucleótidos mencionados en esta sección se encuentran en el anexo 1A.

7.6 Ensayos de inducción con luz.

Para realizar los ensayos de inducción con luz, se inocularon placas de PDA con discos de 5 mm de diámetro de micelio fresco crecido en la oscuridad y se incubaron por 36 h en la oscuridad total, antes de ser expuestas a la

condición de luz deseada. Para poder colectar el micelio necesario para la extracción de RNA, las placas de PDA fueron cubiertas con celofán antes de colocarles el disco de micelio. Para evaluar el conjunto de genes independientes de *blr1* bajo diferentes calidades de luz mediante RT-qPCR, la cepa silvestre o las mutantes $\Delta blr1$, $\Delta phr1$ o $\Delta cry1$, fueron expuestas a un pulso de luz azul o luz roja ($1200 \mu\text{molm}^{-2}$) en una cámara de incubación equipada con diodos emisores de luz monocromática (Percival Scientific, Wisconsin, U.S.). Enseguida, los cultivos fueron incubados por 30 min en oscuridad a 28°C . Después de este tiempo, el micelio fue colectado en un cuarto oscuro bajo una luz roja de seguridad e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido para la extracción de RNA. Para el análisis de la expresión de los genes *cry1* y *cry-DASH*, la cepa silvestre después de ser crecida en la oscuridad, fue expuesta a un pulso de luz blanca ($23.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) por 5 min, o $1200 \mu\text{molm}^{-2}$ de luz azul ($4.7 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), luz verde ($1.67 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) o luz roja ($7.9 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para analizar la expresión de los genes *cry1* y *phr1*, las cepas silvestre, $\Delta blr1$, $\Delta phr1$ o $\Delta cry1$ fueron expuestas a un pulso de luz blanca ($23.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) por 5 min. Enseguida los cultivos fueron incubados por 30 min en la oscuridad a 28°C . Después de este tiempo, el micelio fue colectado como se describió previamente e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido para la extracción de RNA.

7.7 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR).

Inicialmente se obtuvieron datos de expresión génica mediante un análisis de secuenciación 454 de micelio incubado en luz blanca, obteniendo un conjunto de genes expresados de manera independiente del fotorreceptor de luz azul, *Blr1*. A partir de estos datos se seleccionó un conjunto de genes para su evaluación bajo diferentes longitudes de onda y en diferentes mutantes en genes que codifican potenciales receptores de luz azul. El análisis de la expresión se realizó mediante RT-qPCR. Para ello se diseñaron oligonucleótidos para producir un amplicón de 150 pb aproximadamente (Anexo 1B). El micelio de las cepas silvestre, $\Delta blr1$, $\Delta phr1$ o $\Delta cry1$ se obtuvo

de cultivos crecidos en la oscuridad total por 36 h y los cuales, enseguida se expusieron a un pulso de luz roja o azul ($1200 \mu\text{mol m}^{-2}$). El micelio fue congelado en nitrógeno líquido para la posterior extracción del RNA. El cDNA fue sintetizado utilizando la RT II SuperScript de Invitrogen. La mezcla de reacción para el qPCR consistió de lo siguiente: 10 μl de SYBR Green master mix (Applied Biosystems), 3 μl de cDNA ($3\text{ng}/\mu\text{l}$) y 1 μl de cada uno de los oligos ($10 \mu\text{M}$) indicados en el anexo 1B. El programa de PCR fue el siguiente: un ciclo a 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 40 segundos. Se obtuvieron "melting curves" por cada producto, iniciando de 60°C a 95°C a $0.2^\circ\text{C}/\text{seg}$, produciendo un solo punto de fusión. Cada reacción se realizó por triplicado a partir de dos réplicas biológicas.

7.8 Análisis de fotoconidiación.

Para los ensayos de fotoconidiación se inocularon placas de PDA con discos de micelio como se indicó en la sección 7.6, a partir de las cepas silvestre, Δops , Δcry1 o $\Delta\text{cry-DASH}$, estas se incubaron a 28°C en la oscuridad total por 36 h y posteriormente fueron expuestas a $1200 \mu\text{mol m}^{-2}$ de luz azul. Enseguida se incubaron nuevamente en la oscuridad durante 48 h a 28°C para la formación del anillo de conidios. Para el ensayo de fotoconidiación en luz verde, la cepa silvestre o Δops fueron expuestas a diferentes dosis de luz verde. Se utilizó una cámara equipada con lámparas fluorescentes que emiten luz blanca, la luz verde se obtuvo mediante el uso del filtro LEE 139 primary Green con un rango de longitud de onda de 480 a 560 nm con un máximo a 530 nm que deja pasar $1.67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz verde. Después de ser expuestas a la luz verde las placas de PDA fueron incubadas en la oscuridad total por 48 h a 28°C para la formación del anillo de conidios. Los controles de oscuridad fueron placas de PDA inoculadas con la cepa correspondiente cubiertas totalmente con papel aluminio para evitar el paso de luz e incubadas en la misma cámara de crecimiento que las placas expuestas al pulso de luz.

7.9 Análisis del crecimiento.

Para los ensayos del crecimiento se inocularon cajas de Petri de 15 cm de diámetro con aproximadamente 70 ml de PDA, con un disco de micelio fresco previamente crecido en la oscuridad de las cepas silvestre, *Δops*, *Δcry1* o *Δcry-DASH*. El crecimiento se desarrolló en una cámara de incubación equipada con diodos emisores de luz monocromática (Percival Scientific, Wisconsin, U.S.). Las placas fueron incubadas en la oscuridad (envueltas en aluminio para evitar el paso de la luz) o en la luz azul constante ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 72 horas dentro de la misma cámara de incubación. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro de la colonia. Para los ensayos de crecimiento en luz verde la cepa silvestre y *Δops* se crecieron en una cámara de crecimiento equipada con lámparas fluorescentes que emiten luz blanca, y para obtener la luz verde se colocaron discos del filtro LEE 139 primary GREEN que se indicó en la sección 7.8 sobre la tapa de las cajas de cultivo. Las cajas se envolvieron en papel aluminio excepto la tapa, permitiendo de esta manera el paso de la luz solo a través del filtro. Para los controles de oscuridad las placas de PDA inoculadas con la cepa correspondiente fueron envueltas completamente en papel aluminio e incubadas en la misma cámara de crecimiento que las placas expuestas a la luz.

7.10 Ensayos de fotorreactivación *in vivo* en *T. atroviride*.

Para analizar la función en la fotorreactivación de potenciales DNA fotoliasas, así como de los genes *blr* en *T. atroviride*, se inocularon gotas con 200 esporas en placas de PDA con Triton X-100 al 0.5%. Posteriormente se irradiaron en un Stratalinker UV crosslinker Modelo 2400 con luz UVC de 254 nm a una dosis de 450 J/m^2 , y enseguida se incubaron en luz blanca

continua u oscuridad a 28°C por 24 h para observar su crecimiento al microscopio. Para determinar el porcentaje de sobrevivencia, se distribuyeron 200 esporas en placas de PDA con Triton X-100 al 0.5%, enseguida se irradiaron con luz UVC a una dosis de 450 J/m² y posteriormente se incubaron en luz blanca continua u oscuridad por 48 h. Transcurrido este tiempo se contaron las colonias formadas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los controles se trataron de la misma forma excepto por la irradiación con UVC (Guzmán-Moreno y col., 2014; Bluhm y col., 2008).

7.11 Construcciones para la expresión y síntesis de las proteínas PHR1, CRY1 y CRY-DASH.

Se adicionaron los sitios de restricción KpnI y HindIII; BamHI y HindIII, y XbaI y NdeI a los genes *cry1*, *phr1* y *cry-DASH* respectivamente mediante PCR usando los oligonucleótidos KpnI-Cold-6-4cdna-F y HindIII-Cold-6-4cdna-R; BamHI-Cold-phr1-cdna-F y HindIII-Cold-phr1cdna-R, y NdeI-Cold-DASHcdna-F y XbaI-Cold-DASHcdna-R respectivamente (Anexo 1C). El cDNA de cada gen fue obtenido mediante PCR doble unión para ello se diseñaron oligonucleótidos quiméricos específicos para cada gen (Anexo 1C). Los productos de cDNA obtenidos (1.9 kb *cry1*, 1.9 kb *phr1* y 2.9 kb *cry-DASH*) fueron digeridos con las enzimas correspondientes y ligados en pCold I (Takara). Las construcciones obtenidas fueron verificadas mediante digestión con enzimas de restricción e independientemente introducidas mediante transformación (Cohen y col., 1972) a células competentes de la cepa de *Escherichia coli* BL21 star.

7.12 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes PHR1, CRY1 y CRY-DASH.

Para la inducción del gen y síntesis de la proteína correspondiente, la cepa BL21 star portando la construcción de interés, fue crecida en medio LB hasta una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0.7. En este punto el cultivo se separó en dos, uno de ellos se usó como control y el otro se incubó a 15 °C

por media hora sin agitación, enseguida se le adicionó el inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.1 mM para las cepas que portaban los plásmidos pCold-cry1 o pCold-phr1 y 0.5 mM para la que contenía la construcción pCold-cry-DASH. Los cultivos se incubaron a 15 °C por 18 h a 200 rpm; al finalizar este período se tomaron alícuotas (1 ml) de los cultivos sujetos o no a inducción y se centrifugaron (1 min a 15682 x g) para separar las células del medio de cultivo. A continuación, los sedimentos se resuspendieron en regulador Laemli 2X (100mM Tris-HCl pH 6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 0.2% Azul de bromofenol y 20% Glicerol). Los sedimentos se lisaron mediante vibración sónica durante 30 s manteniendo las muestras en baño de hielo durante todo el proceso. Enseguida se centrifugaron (15682 x g) por 1 min, se tomó una alícuota de cada muestra y se hirvieron en baño María por 3 min. A continuación, se analizaron las muestras por medio de electroforesis en gel SDS-PAGE al 12 % para corroborar la producción de la proteína recombinante correspondiente. Para la purificación de las proteínas, se partió de un cultivo de 500 ml; después del tiempo de inducción el cultivo fue centrifugado a 2988 x g por 5 min. Los sedimentos se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento o se procedió de inmediato con su procesamiento como se indica a continuación. Los sedimentos se resuspendieron en regulador de lisis (fosfato de sodio 25 mM, pH 7.5, NaCl 250 mM y glicerol al 5%) en presencia de inhibidores de proteasas (1:100). Se sometieron a vibración sónica por 9 ciclos de 10 s de vibración y 10 s de reposo, las muestras se mantuvieron en un baño de hielo durante todo el proceso. Después se centrifugó a 20,198.7x g a 4 °C por 10 min, se recuperó el sobrenadante y con el sedimento obtenido se repitieron los pasos anteriores hasta que el sedimento fue mínimo. Todas las fracciones de sobrenadante obtenidas se mezclaron, se les adicionó imidazol 10 mM y se aplicaron a una columna de níquel agarosa (Ni-NTA; Qiagen; Valencia, CA) de 2 ml. La muestra de sobrenadantes en contacto con la resina, se mantuvo en agitación suave toda la noche. Enseguida se drenó la columna y se realizaron tres lavados para eliminar la fracción proteica no unida a la resina, para ello, se usaron

10 volúmenes de columna del regulador de lavado (regulador de lisis adicionado con imidazol a una concentración final de 10, 30 o 50 mM para el primer, segundo o tercer lavado respectivamente), entre cada lavado hubo un periodo de agitación suave de 30 min y en cada vez que se drenó la columna se colectó una muestra. Las proteínas unidas fueron eluidas de la resina con 1 ml de regulador de elución (regulador de lisis adicionado con imidazol a una concentración final de 500 mM) en agitación suave toda la noche. Enseguida se colectó esta última fracción y junto con las fracciones previamente colectadas se analizaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 12%. Todo el proceso de purificación de las proteínas se realizó a 4°C.

8. RESULTADOS.

8.1 Obtención de mutantes en potenciales fotorreceptores en *T. atroviride*.

En *T. atroviride* se han descrito respuestas a la luz independientes del fotorreceptor Blr1, sugiriendo la participación de otro u otros sistemas de percepción de luz (Casas-Flores y col., 2004; Rosales-Saavedra y col., 2006). Previamente, en nuestro laboratorio un análisis de secuenciación masiva

permitió identificar un conjunto de genes independientes del fotorreceptor Blr1, y dado que el ensayo se realizó bajo condiciones de inducción con luz blanca, se sugirió que otros sistemas de percepción de luz de diferentes longitudes de onda podrían participar de manera independiente o en conjunto para dar la respuesta transcripcional observada en luz blanca. En el genoma de *T. atroviride* se han identificado varios genes que codifican receptores potenciales de luz como son un gen *ops* (opsina), *cry1* (criptocromo/6-4 fotoliasa), *cry-DASH* (*cry-DASH*), *Taphy* (fitocromo) y *phr1* (CPD fotoliasa); adicionales al ya descrito *blr1* (Schmoll y col., 2010). Previamente, en nuestro laboratorio se generaron mutantes en algunos de estos genes: $\Delta blr1$ (Casas-Flores y col., 2004), $\Delta phr1$ (Berrocal-Tito y col., 2007) y $\Delta Taphy$ (Francisco X. Castellanos, datos no publicados). En un intento por tener completo el conjunto de mutantes en receptores potenciales de luz y tratar de identificar fotorreceptores adicionales a Blr1, se generaron las mutantes sencillas en los genes *ops*, *cry1* y *cry-DASH* mediante la estrategia de PCR-doble unión. Las mutantes obtenidas fueron analizadas mediante PCR y Southern blot, utilizando como blanco el DNA genómico de cada cepa mutante después del tercer pase monospórico (Figuras 1, 2 y 3).

Un total de diez mutantes a las que se removió el gen *cry1*, catorce sin el gen *cry-DASH* y treinta sin el gen *ops*, fueron analizadas mediante dos rondas independientes de PCR, a fin de asegurar un conjunto de mutantes libres de núcleos silvestres. En la Figura 1A, el primer PCR mostró que las diez transformantes $\Delta cry1$ amplificaron la banda esperada, indicando que en todas había ocurrido el reemplazo del gen *cry1* por el casete que porta el marcador de selección *hph* como se observa en la parte superior de la Fig. 1A. El oligonucleótido *cry1p-F* fue usado para descartar una integración ectópica, ya que dicho oligonucleótido se alinea en una región del promotor fuera de la construcción usada. En el segundo PCR se usó el oligonucleótido *cry1p-F* en combinación con el oligonucleótido reverso del marco de lectura del gen *cry1*. En este caso se esperaba amplificación tanto en la cepa silvestre como en las mutantes, pero de diferente tamaño como se indica en la Figura 1A. El resultado mostró que, de las diez

transformantes tres aún contenían núcleos silvestres pues amplificaron una banda del tamaño esperado en la cepa silvestre, en tanto que las otras siete amplificaron específicamente una banda de 2.7 kb correspondiente al tamaño esperado para cepas $\Delta cry1$. De estas siete transformantes se usaron dos para analizarlas mediante Southern blot (mutantes 2 y 22). El DNA de la cepa silvestre y las mutantes $\Delta cry1$ fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI*, *Clal* y *Sall* de manera independiente, y los tamaños esperados para cada restricción se indican en la Figura 1B. En ambas transformantes analizadas se detectaron bandas correspondientes a los tamaños esperados con cada enzima, dejando ver que en ambas transformantes el gen *cry1* fue reemplazado con el “cassette” de resistencia a higromicina. El patrón de bandas observado en la cepa silvestre corresponde con los tamaños esperados para el gen silvestre (Figura 1C).

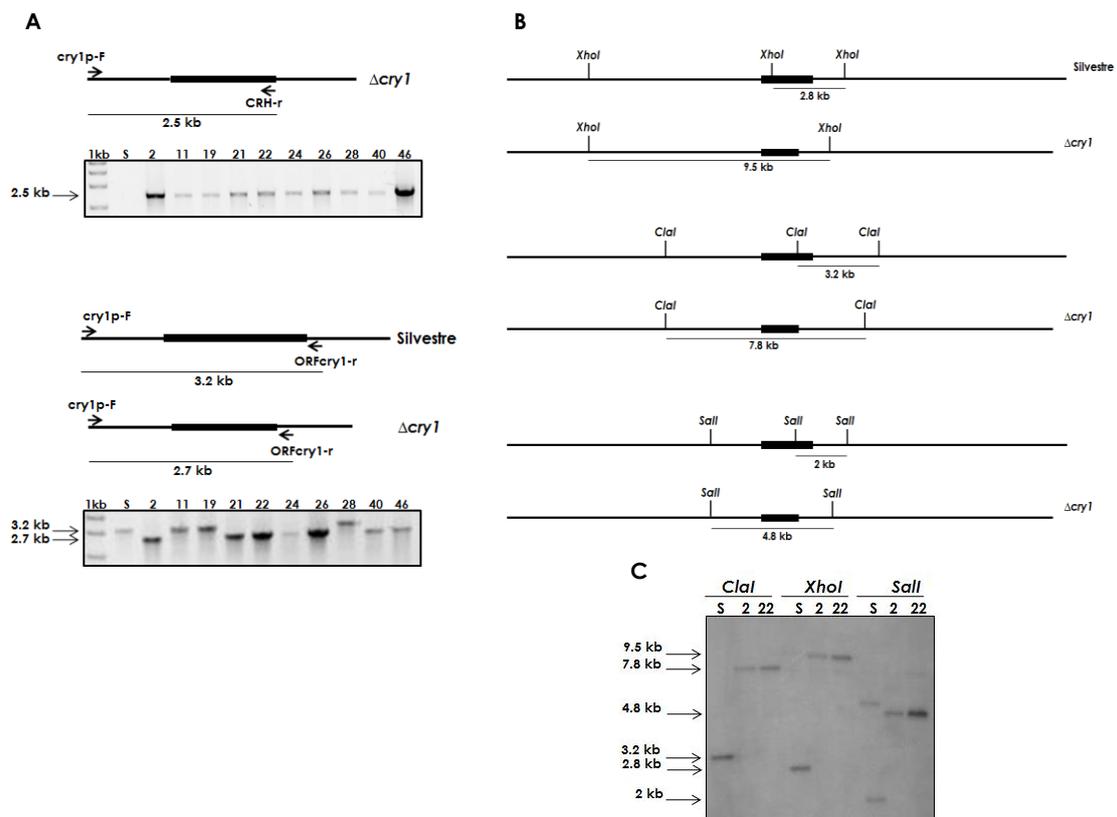


Figura 1. Identificación de las mutantes $\Delta cry1$ mediante PCR y Southern blot.

(A) Identificación mediante PCR. Para la primera reacción de PCR

específico para detectar el reemplazo génico, se utilizaron los oligonucleótidos cry1p-F (oligonucleótido ubicado fuera de la construcción usada para el reemplazo génico) y CHR-r (oligonucleótido reverso para amplificar el gen *hph*), con este par de oligonucleótidos se esperaba un producto de amplificación de 2.5 kb en las cepas mutantes y ninguna amplificación en la cepa silvestre (S). Los oligonucleótidos cry1p-F y ORFcry1-r fueron usados para la segunda reacción de PCR, con este par de oligonucleótidos se esperaba una banda de 3.2 kb en la cepa silvestre y 2.7 kb en las cepas mutantes. El oligonucleótido ORFcry1-r fue diseñado 100 pb después del codón de paro. Los números sobre la foto del gel corresponden a la cepa $\Delta cry1$ analizada. (B) Esquema del patrón de restricción esperado para las cepas silvestre y mutantes usando las enzimas de restricción *XhoI*, *ClaI* and *Sall*. (C) Análisis "Southern blot". El DNA genómico de las cepas silvestre y mutantes fue digerido con las enzimas de restricción indicadas e hibridado con una sonda de 1.45 kb. La sonda incluía 150 pb del ORFcry1 y 1.3 kb de la región 3' UTR.

Para obtener las mutantes en el gen *cry-DASH* se realizaron dos rondas de transformación independientes obteniendo en total catorce transformantes de las cuales, cuatro (transformantes 3, 5, 11 y 12) amplificaron una banda de 2.6 kb (Figura 2A parte superior) correspondiendo al tamaño esperado para las cepas en las cuales el gen *cry-DASH* sería reemplazado por el marcador de selección (*hph*). En dichas mutantes no se observó ningún producto de amplificación cuando se usaron los oligonucleótidos específicos para amplificar el marco de lectura del gen *cry-DASH* confirmando que dichas cepas no portaban núcleos silvestres (Figura 2A parte inferior). Estas cuatro mutantes se usaron para corroborar el reemplazo del gen silvestre mediante análisis tipo Southern blot. El DNA de las cepas silvestre y mutantes (3, 5, 11 y 12), obtenido después del tercer pase monospórico, fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI*, *BamHI* y *HindIII* de manera independiente. En las cuatro transformantes se obtuvieron bandas correspondientes a los tamaños esperados de acuerdo al patrón

de restricción mostrado en la Figura 2B. En la cepa silvestre se detectaron las bandas del tamaño esperado para el gen silvestre (Figura 2C). A partir de estos resultados se seleccionaron las cepas $\Delta cry-DASH-3$ y 5 para posteriores experimentos.

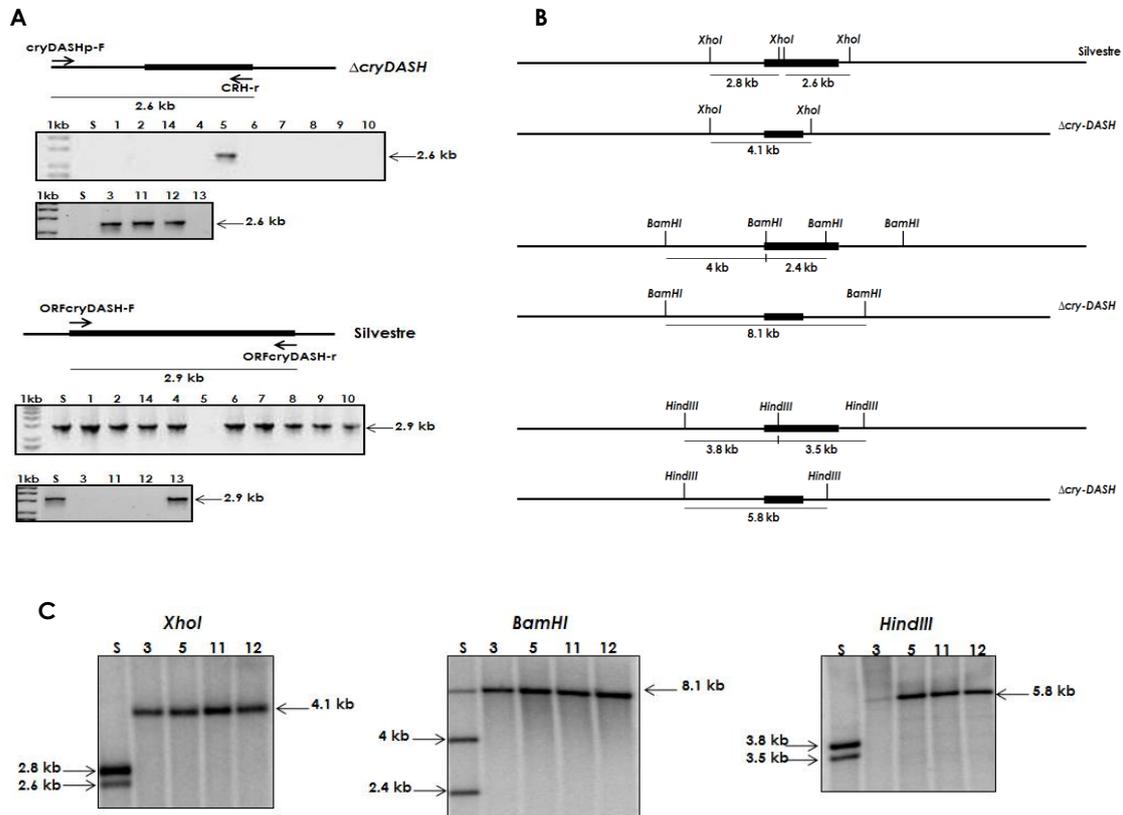


Figura 2. Identificación de las mutantes $\Delta cry-DASH$ mediante PCR y southern blot. (A) Identificación por PCR. Para la primera reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos cryDASHp-F (oligonucleótido ubicado fuera de la construcción usada para el reemplazo del gen *cry-DASH*) y CHR-r (oligonucleótido reverso para amplificar el gen *hph*). Con este par de oligonucleótidos se esperaba un producto de amplificación de 2.6 kb en las cepas mutantes y ninguna banda de amplificación en la cepa silvestre (S). Los oligonucleótidos ORFcryDASH-F y ORFcryDASH-r fueron usados para la segunda reacción de PCR, con este par de oligonucleótidos se esperaba una banda de amplificación de 2.9 kb (correspondiente al *ORF cry-DASH*) en la cepa silvestre y ningún producto de amplificación en las mutantes. Los

números sobre la foto del gel corresponden a la cepa $\Delta cry-DASH$ analizada. (B) Patrón de restricción esperado para las cepas silvestre y mutantes usando las enzimas de restricción *XhoI*, *BamHI* y *HindIII*. (C) Análisis "Southern blot". El DNA genómico de las cepas silvestre y mutantes fue digerido con las enzimas de restricción indicadas e hibridado con una sonda de 3 kb. La sonda incluía 1.33 kb de la región 5' UTR y 1.67 kb del ORF *cry-DASH*.

Para la identificación de las mutantes en el gen de opsina, se seleccionaron treinta mutantes las cuales fueron analizadas mediante dos rondas de PCR (Figura 3). Para la primera reacción de PCR se usaron los oligonucleótidos ORFOPS-F y ORFOPS-R. Con dicho par de oligonucleótidos se esperaba un producto de amplificación de aproximadamente 1 kb correspondiente al marco de lectura del gen *ops*, como se observa en la Figura 3A las mutantes 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 18, 20 y 28 no amplificaron dicha banda sugiriendo que estas mutantes ya no portaban el gen silvestre *ops*. En la segunda reacción de PCR se usaron los oligonucleótidos pOPS-F (oligonucleótido fuera de la construcción para el reemplazo génico) y CRH-r. Con este par se esperaba una banda de amplificación de 2.8 kb en las cepas mutantes Δops . En la Figura 3B se observa que, de las mutantes que no amplificaron el ORF de la opsina, solo la 5, 9 y 10 amplificaron la banda esperada de 2.8 kb sugiriendo que en estas mutantes había ocurrido el reemplazo de la región codificante del gen *ops* por el marcador de selección *hph*. En la mutante 15 se obtuvo amplificación tanto del ORF de opsina como de la banda de 2.8 kb sugiriendo que aún conserva núcleos silvestres. Como un control positivo para la amplificación con el par de oligonucleótidos pOPS-F y CRH-r se utilizó como templado el segundo PCR realizado para obtener la construcción con la cual se hizo el reemplazo del gen *ops* (figura 3B). A partir de estos resultados se seleccionaron las transformantes $\Delta ops9$ y $\Delta ops10$ para posteriores experimentos (figura 3).

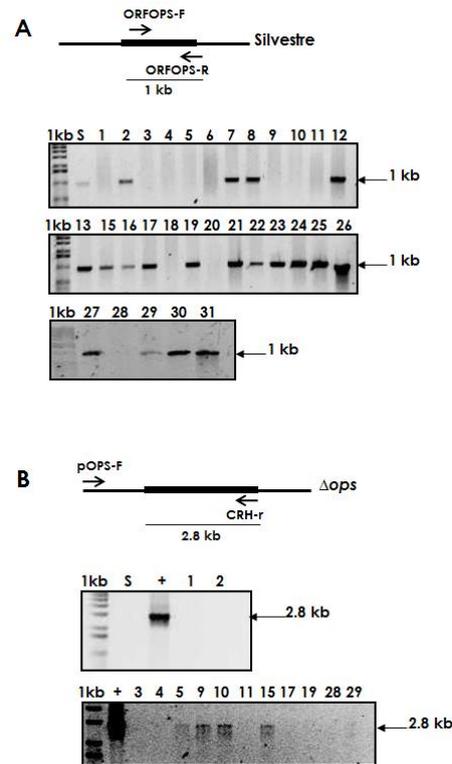


Figura 3. Identificación de las mutantes Δops mediante PCR. Para la primera reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos ORFOPS-F y ORFOPS-R (oligonucleótidos para amplificar el ORF del gen *ops* de aproximadamente 1 kb). Para la segunda reacción de PCR se usaron los oligonucleótidos pOPS-F (oligonucleótido ubicado fuera de la construcción usada para el reemplazamiento del gen *ops*) y CHR-r (oligonucleótido reverso para amplificar el gen *hph*). Con este par de oligonucleótidos se esperaba un producto de amplificación de 2.8 kb en las cepas mutantes y ninguna banda de amplificación en la cepa silvestre (S). Los números sobre la foto del gel corresponden a la cepa Δops analizada y el signo + representa un control positivo.

8.2 Evaluación del papel de los genes *cry1*, *cry-DASH* y *ops* en la fotoconidiación y el crecimiento en *T. atroviride*.

Una de las principales respuestas a la luz observada en *T. atroviride* es la producción de conidios tras un pulso de luz blanca o azul. Con la finalidad

de saber si los genes *cry1* y *cry-DASH* participaban en la regulación de la fotoconidiación, se expusieron colonias de las cepas silvestre, $\Delta cry1$ o $\Delta cry-DASH$ a un pulso de luz blanca o azul. No se observaron diferencias en el anillo de conidias formado en respuesta a la luz en las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre (Figura 4A). Esto sugiere que *cry1* y *cry-DASH* no son necesarios para la fotoconidiación, o alternativamente, puede existir una redundancia de funciones entre genes criptocromo/fotoliasa. Además de la conidiación, la luz también afecta el crecimiento micelial. Por lo tanto, también se evaluó el efecto de la luz azul sobre el crecimiento micelial en las cepas silvestre, $\Delta cry1$ y $\Delta cry-DASH$. Las tres cepas fueron crecidas en luz azul constante ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 72 h, y después de este tiempo se midió el crecimiento total (Figura 4B y tabla 1). Los resultados mostraron que la luz azul tuvo un impacto negativo sobre el crecimiento micelial con respecto a la oscuridad en la cepa silvestre (una reducción del 3%), y que dicha diferencia fue estadísticamente significativa. En las cepas $\Delta cry1$ o $\Delta cry-DASH$ se observó un ligero incremento en el crecimiento micelial en luz azul respecto a la cepa silvestre crecida en esta misma condición (Figura 4B y tabla 1). El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa entre el crecimiento micelial en luz observado en la cepa $\Delta cry-DASH$ y la cepa silvestre. Sin embargo, sí se observó un incremento del 2% en el crecimiento de la cepa $\Delta cry1$ con respecto a la cepa silvestre y dicha diferencia fue estadísticamente significativa (Figura 4B).

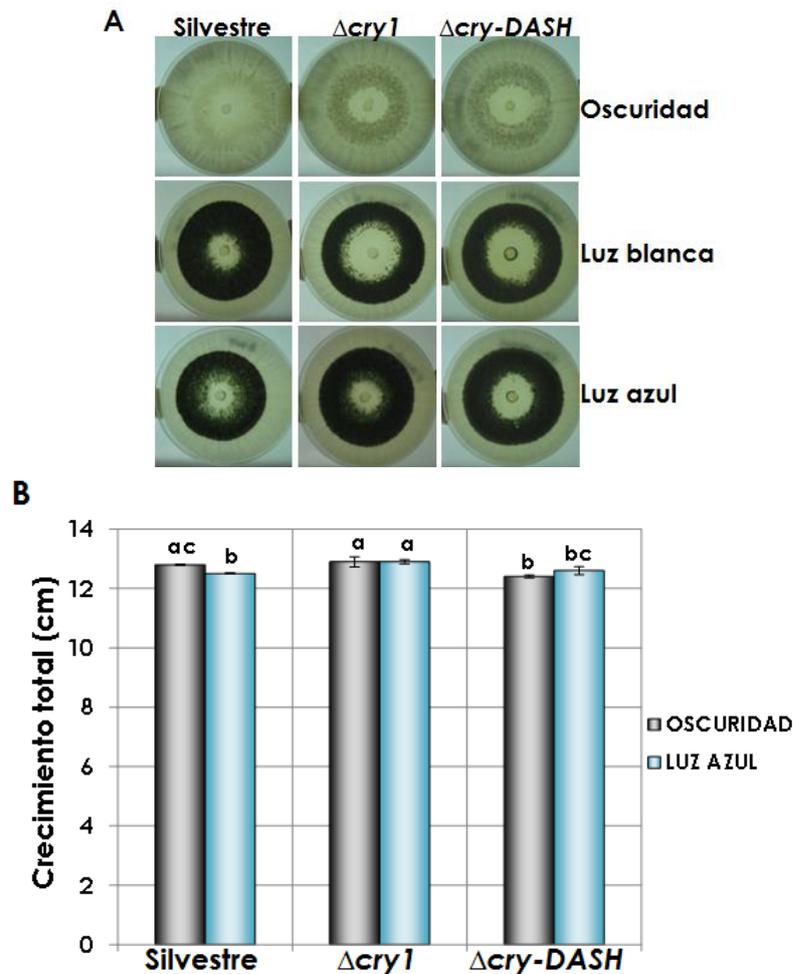


Figura 4. Efecto de la delección de los genes *cry1* y *cry-DASH* en la fotoconidiación y el crecimiento micelial en *T. atroviride*. (A) Ensayo de fotoconidiación. Las cepas silvestre, $\Delta cry1$ y $\Delta cry-DASH$ fueron crecidas en la oscuridad por 36 h, enseguida expuestas a un pulso de luz blanca o azul ($1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$) y nuevamente incubadas en oscuridad por 48 h para observar el anillo de conidias. (B) Crecimiento de las cepas $\Delta cry1$ y $\Delta cry-DASH$ en luz azul. Las cepas silvestre, $\Delta cry1$ y $\Delta cry-DASH$ fueron crecidas en la oscuridad o en luz azul constante ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 72 h. Las gráficas muestran el promedio del crecimiento total de tres réplicas experimentales. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas usando el método de Tukey ($\alpha=0.01$), y se indican con letras diferentes sobre las columnas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Tabla 1. Crecimiento total de las cepas silvestre, $\Delta cry1$ o $\Delta cry-DASH$ en la oscuridad o en luz azul constante. Los datos mostrados corresponden a los promedios de tres experimentos independientes \pm las desviaciones estándar. El crecimiento está dado en centímetros.

| CEPAS | OSCURIDAD | LUZ AZUL |
|-------------------|------------------|------------------|
| Silvestre | 12.84 \pm 0.01 | 12.52 \pm 0.01 |
| $\Delta cry1$ | 12.9 \pm 0.12 | 12.9 \pm 0.06 |
| $\Delta cry-DASH$ | 12.42 \pm 0.05 | 12.6 \pm 0.13 |

En los hongos se ha sugerido que las opsinas participan en la percepción de la luz verde. Pese a que en *T. atroviride* no está documentada ninguna respuesta a dicha longitud de onda, se evaluó el efecto de la luz verde en cepas Δops ya que recientemente se ha sugerido que los diferentes sistemas de percepción pueden participar a manera de un complejo para regular las respuestas a la luz en *N. crassa* (Olmedo y col., 2009) y *A. nidulans* (Purschwitz y col., 2008), y que la ausencia de alguno de ellos puede ocasionar un desbalance en tales respuestas. Con la finalidad de saber si la ausencia del gen *ops* afectaba la fotoconidiación en *T. atroviride*, las cepas silvestre y Δops fueron expuestas a diferentes dosis de luz verde (Figura 5A). No se observó ninguna diferencia entre las cepas silvestre y mutantes ni entre las condiciones de luz u oscuridad confirmando que la luz verde no induce la conidiación en *T. atroviride* y que la ausencia del gen *ops* no altera dicho efecto. Enseguida se evaluó la fotoconidiación en las cepas Δops pero bajo condiciones de luz azul (longitud de onda que sí induce la conidiación) y tampoco se observó una diferencia fenotípica entre las cepas silvestre y Δops (Figura 5B), sugiriendo que, al menos bajo estas condiciones experimentales, la opsina de *T. atroviride* no participa en la fotoconidiación.

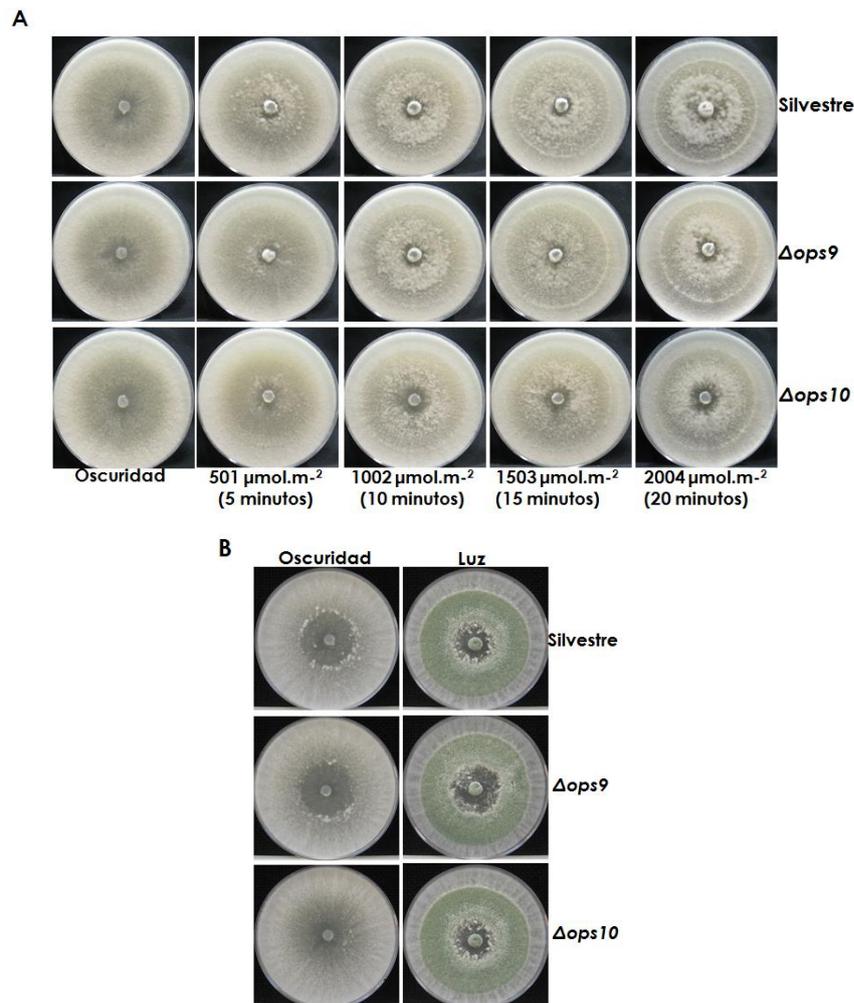


Figura 5. Análisis del efecto de la delección del gen ops en la fotoconidiación en *T. atroviride*. (A) Ensayo dosis-respuesta. Las cepas silvestre, $\Delta ops9$ y $\Delta ops10$ fueron crecidas en la oscuridad por 36 h, enseguida expuestas a diferentes dosis de luz verde ($1.67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) como se indica en la figura, y nuevamente incubadas en oscuridad por 48 h. (B) Ensayo de fotoconidiación. La cepa silvestre, $\Delta ops9$ y $\Delta ops10$ fueron crecidas en la oscuridad por 36 h, enseguida expuestas a un pulso de luz azul ($1200 \mu\text{mol.m}^{-2}$) y nuevamente incubadas en oscuridad por 48 h.

Como la luz también afecta el crecimiento micelial en *T. atroviride*, se analizó el crecimiento en las mutantes en el gen de opsina (Figura 6). Las cepas silvestre, $\Delta ops9$ y $\Delta ops5$ fueron crecidas en luz azul constante u oscuridad por 72 h, y después de este tiempo se midió el crecimiento total.

En la Figura 6A se muestra la gráfica obtenida a partir de estos datos. De acuerdo con reportes previos (Casas-Flores y col., 2004), se observó que la luz azul generó una reducción estadísticamente significativa del crecimiento respecto a la oscuridad en la cepa silvestre. En las mutantes carentes del gen opsina también se observó una reducción del crecimiento en luz con respecto a la oscuridad, la cual no fue estadísticamente significativa en la cepa $\Delta ops5$, mientras que la diferencia observada en la cepa $\Delta ops9$ sí lo fue. Sin embargo, el análisis de la reducción del crecimiento en luz no tuvo diferencia estadísticamente significativa entre las cepas silvestre y mutantes Δops (Figura 6A). Adicionalmente se evaluó el crecimiento micelial en luz verde constante por 72 h. En la Figura 6B se muestran las fotografías del crecimiento bajo esta condición de luz. En este caso no se observó que la luz afectara el crecimiento micelial ya que las tres cepas crecieron igual en luz verde u oscuridad (Figura 6B), y tampoco se observaron diferencias en el crecimiento entre las cepas mutantes y silvestre.

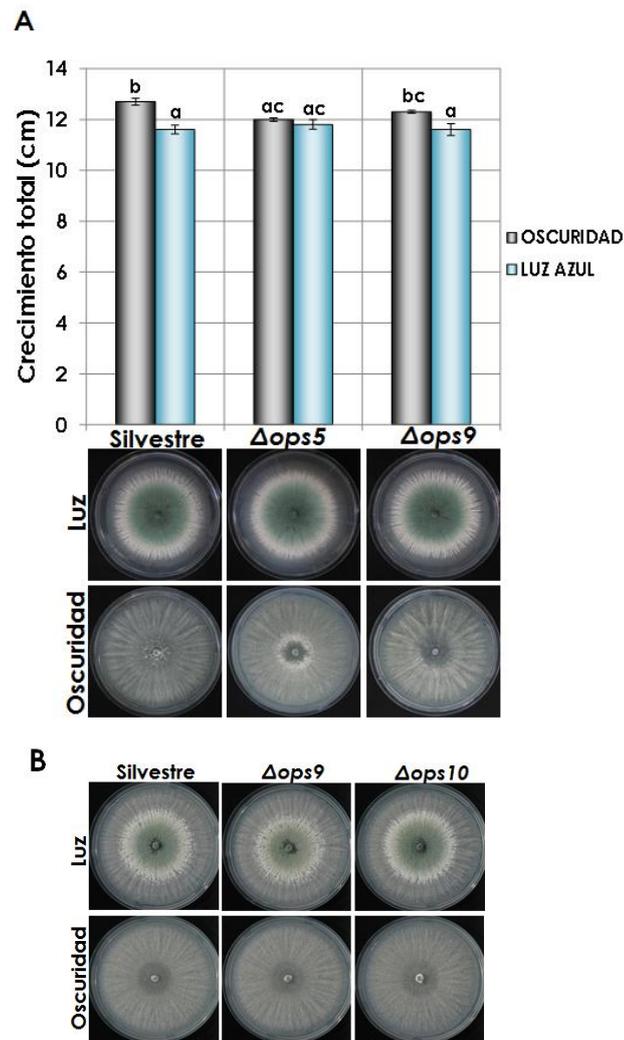


Figura 6. Análisis del crecimiento micelial en cepas Δops en *T. atroviride*. (A) Crecimiento de las cepas $\Delta ops9$, $\Delta ops5$ y silvestre en luz azul. Las cepas silvestre, $\Delta ops9$ y $\Delta ops5$ fueron crecidas en la oscuridad o en luz azul constante ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 27°C y el crecimiento se determinó a las 72 h. Las gráficas muestran el promedio de tres réplicas experimentales. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas usando el método de Tukey ($\alpha=0.01$), y se indican con letras diferentes sobre las columnas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. (B) Crecimiento de las cepas $\Delta ops9$, $\Delta ops5$ y silvestre en luz verde. Las cepas silvestre, $\Delta ops9$ y $\Delta ops10$ fueron crecidas en la oscuridad o en luz verde constante ($1.67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 72 h, transcurrido este tiempo se tomaron las fotografías mostradas.

8.3 Análisis de la expresión del gen *cry1* en la luz.

Con la finalidad de determinar si los genes *cry1* y *cry-DASH* son regulados por la luz, se analizó mediante RT-qPCR la expresión de dichos genes a partir de micelio expuesto a luz de diferentes longitudes de onda u oscuridad. El RNA total fue aislado 30 min después de la exposición a la luz. Como se observa en la Figura 7A, el gen *cry1* fue inducido por la luz blanca o azul específicamente. Con la finalidad de determinar si el gen *cry1* es regulado por la luz a través del fotorreceptor Blr1, también se analizó su expresión en la mutante $\Delta blr1$. En la Figura 7B se observa una reducción en los niveles de expresión del gen *cry1* tras la exposición a la luz blanca relativa a la cepa silvestre, sugiriendo que la expresión de *cry1* en luz es dependiente de la presencia de *blr1* funcional. Adicionalmente, el análisis de expresión de los genes *phr1* y *cry1* en la luz blanca muestra que la inducción de *phr1* se reduce considerablemente en $\Delta cry1$ y que la inducción de *cry1* es reducida aproximadamente en un 40% en la cepa $\Delta phr1$ comparada a la cepa silvestre (Figura 7B). Estos datos sugieren la existencia de una regulación cruzada entre DNA fotoliasas. Previamente se había sugerido que Phr1 puede modular a las proteínas Blr y así regular su propia expresión en luz (Berrocal-Tito y col., 2007). Es probable que la regulación cruzada observada entre *phr1* y *cry1* tras la exposición a la luz blanca tenga lugar a través de la modulación del complejo Blr. En contraste, nosotros no pudimos detectar efectos en la expresión del gen *cry-DASH* ni del gen *ops* bajo ninguna de las condiciones de luz usadas.

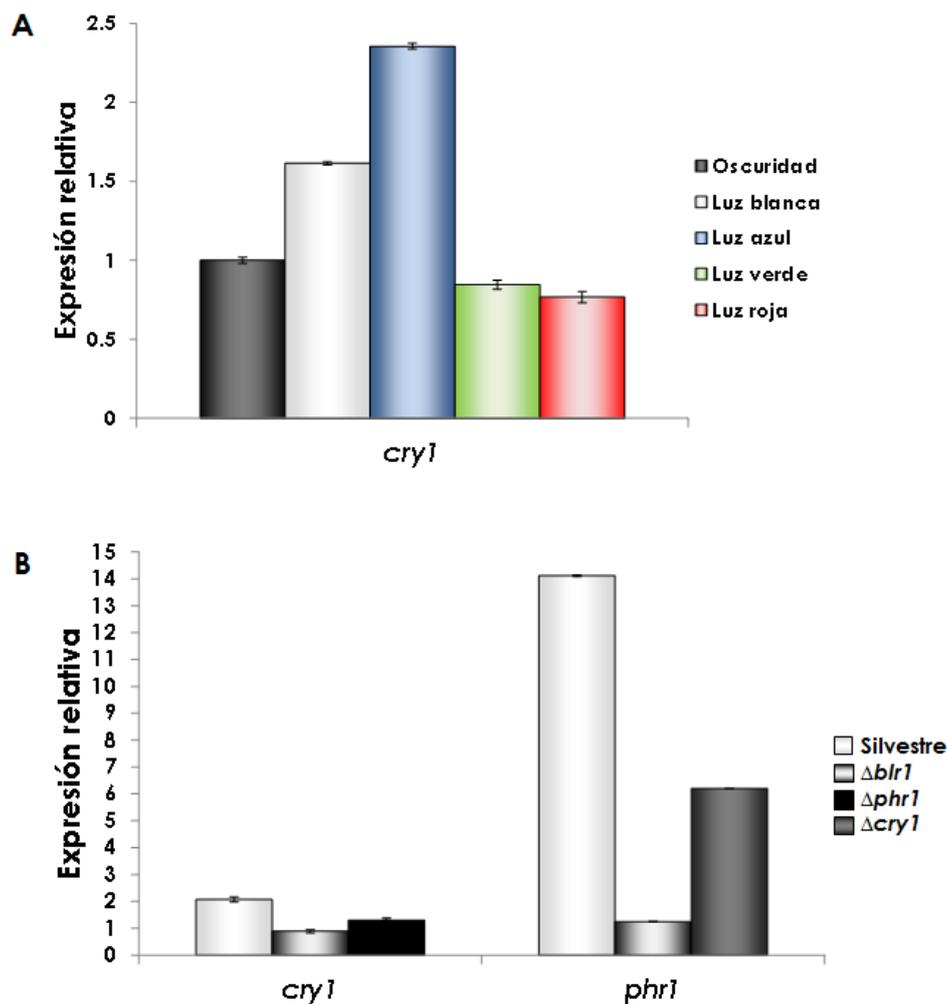


Figura 7. Análisis de la expresión de los genes criptocromo/fotoliasa de *T. atroviride* en la luz. A) Análisis de la expresión del gen *cry1* bajo diferentes longitudes de onda de luz. El RNA total fue aislado a partir de la cepa silvestre 30 min después de la exposición a un pulso de 5 minutos de luz blanca ($23.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o $1200 \mu\text{mol m}^{-2}$ de luz azul, verde o roja para el análisis de expresión. (B) Análisis de la expresión de los genes *cry1* y *phr1* en diferentes fondos genéticos. El análisis de los genes *cry1* y *phr1* fue realizado a partir de RNA total extraído 30 min después de la exposición a un pulso de 5 min de luz blanca ($23.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de las cepas silvestre, $\Delta blr1$, $\Delta cry1$ y $\Delta phr1$. Los niveles de expresión en la luz son relativos a la expresión en la oscuridad. Los niveles de transcrito fueron determinados por qPCR usando *gpd* como gen de referencia. Las gráficas representan el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar.

8.4 El gen *cry1* es necesario para la fotorreactivación *in vivo* en *T. atroviride*.

Se han identificado genes de la familia criptocromo/fotoliasa con funciones tanto de fotorreceptor como de reparación de DNA en varios hongos (Berrocal-Tito y col., 2007; Bayram y col., 2008; Bluhm y Dunkle, 2008), sugiriendo una función dual en estas proteínas como enzimas de reparación de DNA y como fotorreceptores. Previamente se demostró que *phr1* es indispensable para la fotorreactivación en *T. atroviride* (Berrocal-Tito y col., 2007). En una primera aproximación sobre la elucidación de la función de los genes criptocromo/fotoliasa, decidimos investigar si además de *phr1*, otros miembros de la familia criptocromo/fotoliasa de *T. atroviride* (*cry1* y *cry-DASH*) eran necesarios para la fotorreactivación *in vivo* en este hongo. Para ello realizamos un ensayo de fotorreactivación en el cual se expusieron esporas de las cepas $\Delta cry1$, $\Delta cry-DASH$, $\Delta phr1$ y silvestre a la luz ultravioleta C (UVC), y enseguida se incubaron en luz u oscuridad. Como se observa en la Figura 8, *T. atroviride* claramente tiene la capacidad de llevar a cabo fotorreactivación y ésta depende principalmente de la CPD fotoliasa *phr1*. Sin embargo, la carencia de *cry1* también muestra una clara reducción en la fotorreactivación (aproximadamente 30%) respecto a la cepa silvestre (Figura 8B). Estos resultados sugieren que ambas enzimas son indispensables para una fotorreactivación completa. En contraste, la cepa $\Delta cry-DASH$ muestra un fenotipo prácticamente igual al de la cepa silvestre sugiriendo que este gen es dispensable para la fotorreactivación *in vivo*, bajo las condiciones de nuestro ensayo (Figuras 8A).

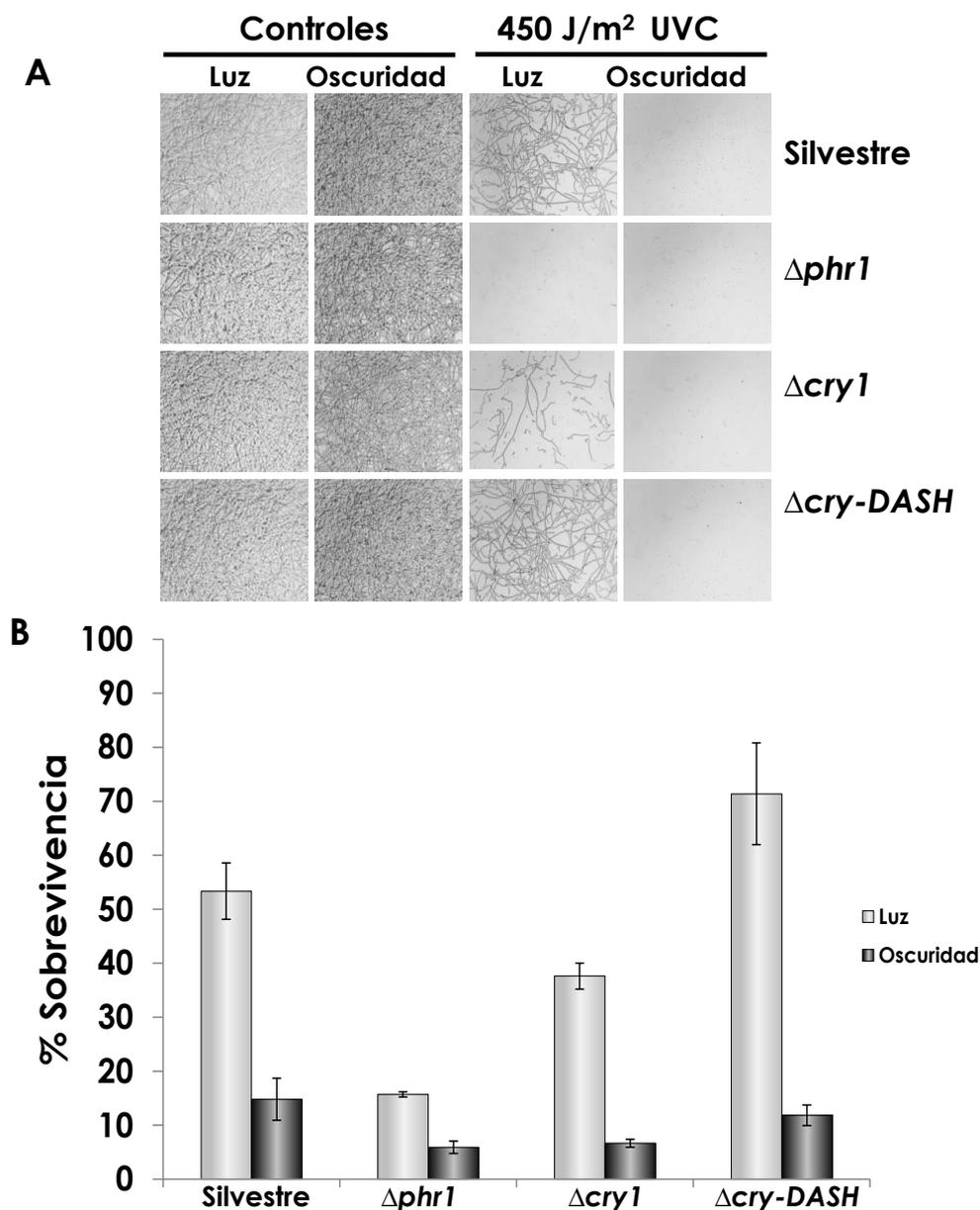


Figura 8. Ensayo de fotorreactivación *in vivo* en *T. atroviride*. Esporas de las correspondientes cepas fueron irradiadas con 450J/m² de luz UVC e incubadas en luz u oscuridad por 24h (A) ó 48h (B). Después de este tiempo se tomaron las fotografías para (A) o se determinó el porcentaje de sobrevivencia en (B).

Con la finalidad de realizar ensayos de reparación de fotolesiones de DNA *in vitro*, se decidió expresar heterológicamente a los genes que codifican a las proteínas CRY1, CRY-DASH y PHR1. Para ello se diseñaron

oligonucleótidos para amplificar el cDNA de cada gen. A cada oligonucleótido se le adicionó un sitio de restricción que permitiera la clonación del respectivo cDNA en el vector de expresión pCold I. Este vector etiqueta los productos resultantes con un oligopéptido de seis histidinas en el extremo N-terminal lo que permitiría la posterior purificación de las proteínas quiméricas. Se generaron las construcciones pCold-phr1, pCold-cry1 y pCold-cry-DASH para la expresión heteróloga de las proteínas criptocromo-fotoliasa (Figuras 9A, B y C). Cada construcción fue corroborada mediante digestión con enzimas de restricción que liberaron el cDNA clonado (Figura 9D). Las construcciones se introdujeron por transformación en la cepa *E. coli* BL21 star, y luego de verificar su presencia en este fondo genético se realizaron ensayos de inducción con las cepas correspondientes con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la producción de cada proteína. En la Figura 10 se muestra en un gel de SDS-PAGE la producción de las proteínas CRY1, PHR1 y cry-DASH. Se observó una banda enriquecida en la condición de inducción con IPTG para las proteínas CRY1 (A), CRY-DASH (B) y PHR1 (C). Una vez corroborado que las proteínas CRY1, CRY-DASH y PHR1 se produjeron en *E. coli* BL21 star, se procedió a su purificación. Dado que las proteínas portaban una etiqueta de seis histidinas, la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en una columna empacada con resina de Agarosa-Ni. Después de la elución de las proteínas se realizó un análisis por electroforesis SDS-PAGE para observar el resultado de la purificación. Solo la proteína PHR1 pudo ser purificada parcialmente, observando una banda principal de 72 kDa, correspondiente al peso molecular de PHR1. CRY1 y CRY-DASH no pudieron ser purificadas. Probablemente porque estas proteínas se encontraban en cuerpos de inclusión, para lo cual está recomendado usar condiciones desnaturizantes a fin de poder solubilizarlas. Se probaron varios reguladores de lisis bajo condiciones desnaturizantes para tratar de solubilizarlas; sin embargo, bajo ninguna de las condiciones usadas se logró obtener las proteínas CRY1 y CRY-DASH.

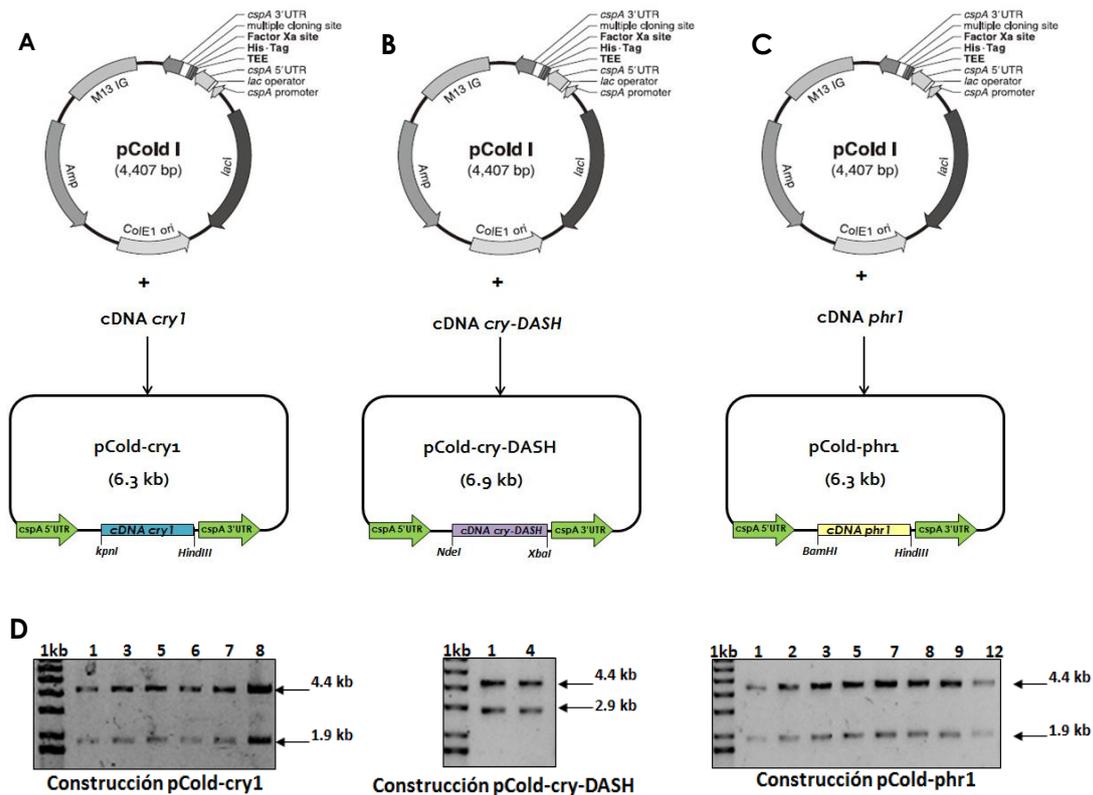


Figura 9. Construcciones para la expresión heteróloga de las proteínas criptocromo/fotoliasa. A, B y C Esquema de las construcciones pCold-*cry1*, pCold-*cry-DASH* y pCold-*phr1* respectivamente. D) Comprobación de las construcciones pCold mediante enzimas de restricción. Las construcciones fueron digeridas con las enzimas correspondientes a los sitios sitios de restricción adicionados al inicio y final del cDNA clonado. Los números sobre el gel indican el número de clona analizada.

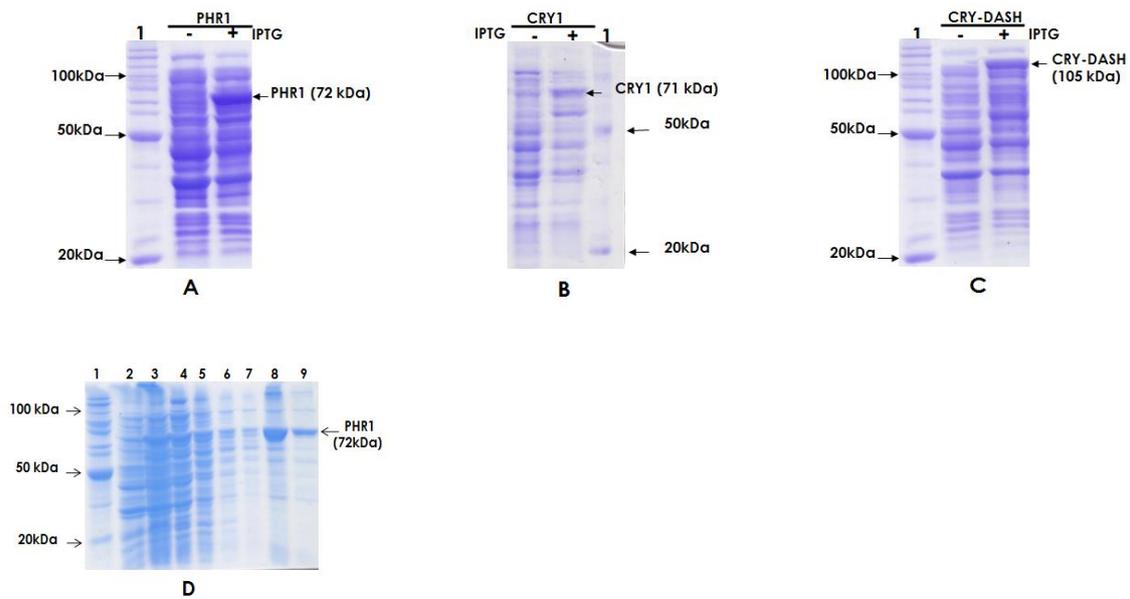


Figura 10. Análisis de la expresión y producción heteróloga de las proteínas criptocromo/fotoliasa en BL21 star y purificación de PHR1. A), B) y C) Resultados de la expresión de la construcción en pCold en BL21 star. 1 marcador de peso molecular, el signo menos corresponde al control sin inducción, el signo + indica adición de IPTG 0.1 mM en A y B y 0.5 mM en C. D) SDS-PAGE de la proteína PHR1 purificada. La purificación se realizó usando una columna de afinidad a Ni. Después de la elución con imidazol 500 mM, la proteína fue observada en un gel de poliacrilamida al 12 %, donde una banda de 72 kDa fue mayoritariamente observada.

8.5 Análisis del papel de los genes *blr* en la fotorreactivación *in vivo* en *T. atroviride*.

Previamente se había demostrado que *phr1* es regulado por luz a través de *blr1*. En este trabajo se encontró que además de *phr1*, el gen *cry1* también es regulado por la luz a través de *blr1* (Figura 7) y que ambos genes son necesarios para una fotorreactivación *in vivo* total (Figura 8). Estos datos sugieren que *blr1* podría estar regulando la fotorreactivación vía el control transcripcional de los genes *phr1* y *cry1*. Con la finalidad de aclarar el papel de *blr1* en la fotorreactivación, se expusieron esporas de $\Delta blr1$ a radiación

UVC y se incubaron en la luz u oscuridad para observar el efecto en la fotorreactivación. Como se observa en la Figura 11A, *blr1* es claramente indispensable para la fotorreactivación de *T. atroviride*. Dado que se ha sugerido que *blr1* y *blr2* podrían funcionar a manera de complejo para el control transcripcional de genes responsivos a la luz (Rosales-Saavedra y col., 2006), también se evaluó el papel de *blr2* en la fotorreactivación. Para esto se utilizó una cepa sobre-expresante del gen *blr2* (*SEblr2*). En la cepa *SEblr2*, todas las respuestas reguladas por la luz se encuentran aumentadas (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007). Los resultados obtenidos mostraron un claro incremento en la resistencia de *SEblr2* a la radiación ultravioleta respecto a la cepa silvestre (Figura 11A). El análisis de expresión de los genes *phr1* y *cry1* mediante *northern blot* en una cepa *SEblr2*, mostró un aumento en los niveles de mensajero tras la inducción con luz (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007 y Figura 11B). En conjunto estos resultados muestran que los genes *blr* regulan la fotorreactivación mediante el control transcripcional de los genes DNA fotoliasas, *phr1* y *cry1*.

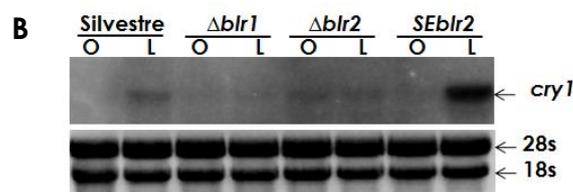
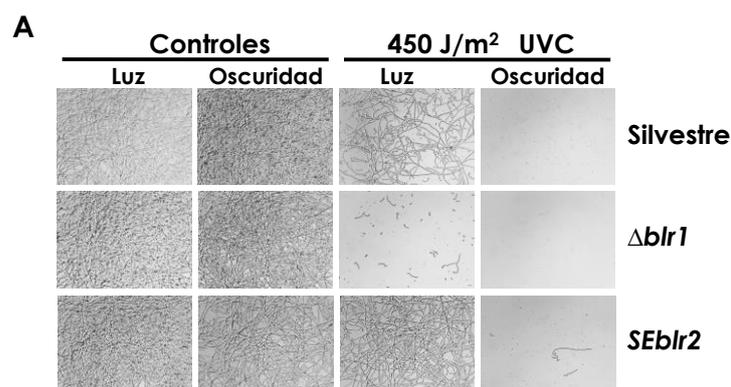


Figura 11. Los genes *blr1* y *blr2* son necesarios para la fotorreactivación *in vivo* en *T. atroviride*. A) Ensayo de fotorreactivación *in vivo*. Para el ensayo se tomaron 150 esporas de las cepas silvestre, $\Delta blr1$ o $SEblr2$, y se irradiaron con 450 J/m² de luz UVC e incubadas en la luz u oscuridad. Las fotografías se tomaron 24 h después de su incubación en la luz o en la oscuridad. Como un control se incluyeron las cepas sin irradiar con UVC. B) Análisis de la expresión del gen *cry1* en las cepas $\Delta blr1$, $\Delta blr2$ y $SEblr2$. Para el ensayo se usaron 20 µg de RNA total aislado del micelio de cada cepa crecida en la oscuridad (O) o 30 min después de un pulso de luz azul de 1200 µmol.m⁻² (L). El RNA se separó en geles de agarosa desnaturalizante, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con una sonda de 1.6 kb del gen *cry1* marcada con ³²P-α-dCTP. Los rRNA fueron detectados mediante tinción con bromuro de etidio.

8.6 Efecto de la luz roja o azul sobre la expresión de genes regulados por luz blanca.

Previamente, mediante un ensayo de secuenciación 454 en nuestro laboratorio, se identificaron 328 genes regulados por luz blanca de los cuales 77 fueron regulados de manera independiente del fotorreceptor Blr1, sugiriendo la participación de otro u otros sistemas de percepción de luz en la reprogramación transcripcional tras la percepción de luz. Con la finalidad de conocer el componente de la luz blanca involucrado en la regulación de algunos de los genes identificados, se analizó el efecto de luz de diferentes longitudes de onda en un conjunto de genes obtenido a partir de los datos de secuenciación 454. El conjunto comprendió tanto genes inducidos como reprimidos por la luz, de los cuales cinco fueron independientes de *blr1* y dos dependientes de *blr1*. Para el ensayo, la cepa silvestre se creció en oscuridad total y posteriormente se expuso a luz azul o roja como se describió en materiales y métodos. Enseguida se incubó en la oscuridad nuevamente, por un periodo de 30 min. Además, también se

expuso la cepa silvestre a un pulso de luz verde; para lo cual se utilizó un filtro especial (LEE No. 139 GREEN). El comportamiento de la expresión de los genes fue muy similar entre la luz azul y la verde, por lo que se decidió continuar los ensayos solo con luz roja y azul. Los genes independientes de *blr1* evaluados fueron, *hsp20-1* y *hsp20-2* ("heat-shock proteins", Id. 255394 y 301737 respectivamente), *fads1* (desaturasa de ácidos grasos, Id. 296851), *cpa1* (peptidasa putativa M14, carboxipeptidasa A, Id. 301733) y *gp-1* (peptidasa putativa G1, Id. 298116); y los dos genes dependientes de *blr1* fueron *phr1* (Id. 302457) y *cry1* (Id.86846). El gen *cry1* fue identificado como regulado por la luz de manera dependiente de *blr1* por medio de qPCR en este trabajo (ver arriba). Como se observa en la Figura 12, los genes *phr1* y *cry1* fueron inducidos específicamente por la luz azul, acorde a su dependencia del fotorreceptor de luz azul Blr1. Los genes *hsp20-1* y *hsp20-2* que codifican proteínas de choque térmico fueron significativamente inducidos por la luz roja (hasta 6 veces de inducción). Sin embargo, la luz azul también tuvo un impacto sobre la expresión de dichos genes (1.8 y 2.5 veces de inducción). La luz roja también afectó de manera específica la expresión del gen *fads1*, el cual mostró un incremento en su expresión (2 veces de inducción). Para el resto de los genes tanto la luz azul como la luz roja tuvieron casi el mismo efecto cuantitativo sobre su expresión, y dichos cambios fueron relativamente modestos. En resumen, tanto la luz azul como la luz roja inducen cambios en la expresión de los genes evaluados. Estos resultados sugieren que los sistemas sensoriales de luz roja y azul trabajan de manera conjunta en la regulación de la expresión de los genes analizados.

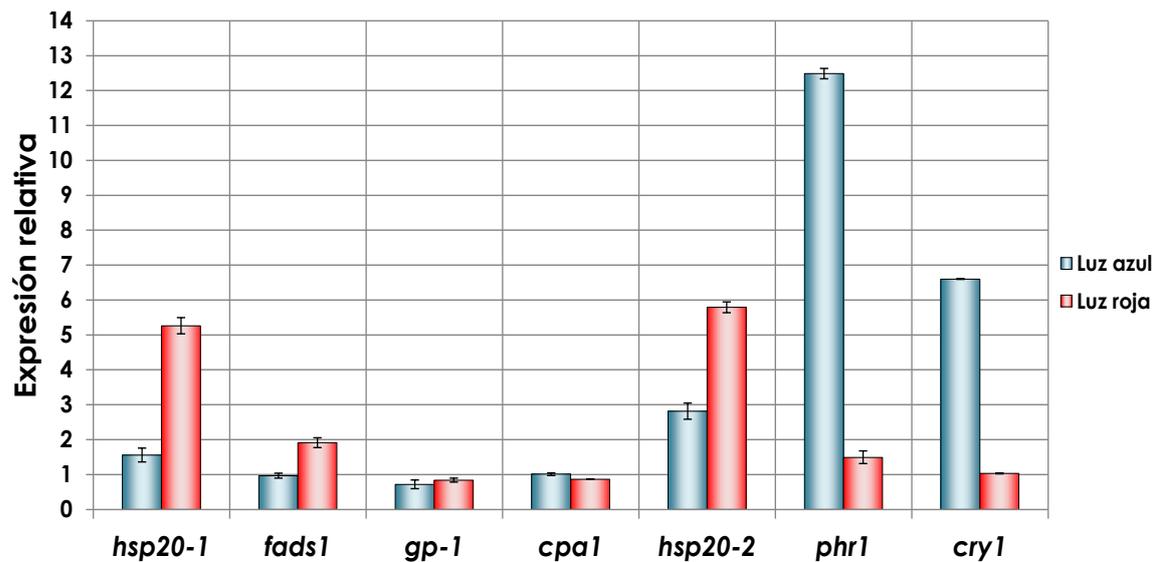


Figura 12. Efecto de la luz roja o azul sobre la expresión de genes independientes de *blr1*. El RNA total fue aislado a partir de la cepa silvestre crecida en la oscuridad o después de un pulso de luz roja o azul de 1200 μmolm^{-2} para el análisis de expresión de los genes. Los niveles de transcrito fueron determinados por medio de qPCR usando *gpd* como gen de referencia. Los niveles de expresión son relativos a la expresión en la oscuridad. Las gráficas representan el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar.

8.7 Efecto de la remoción de los genes *cry1* o *phr1* sobre la expresión de genes independientes de *blr1* bajo condiciones de inducción con luz roja o azul.

Tras la percepción de la luz, una reprogramación transcripcional da lugar a las distintas respuestas a la luz observadas en *T. atroviride*. Con el objetivo de saber si *cry1* además de su papel en la fotorreactivación estaba involucrado en la regulación transcripcional de genes regulados por la luz independientes de Blr1, se analizó la expresión del conjunto de genes previamente seleccionado (Figura 12) en la cepa $\Delta cry1$. En el análisis también se incluyó a la cepa $\Delta phr1$ porque *phr1* es el otro miembro de la

familia criptocromo/fotoliasa que podría estar involucrado en las respuestas a la luz, independientes de *blr1*. Adicionalmente se incluyó la cepa Δ *blr1* para verificar la expresión de los genes independientes de *blr1* en luz monocromática. Como se muestra en la Figura 13, la regulación transcripcional por la luz resulta bastante compleja y específica para cada gen analizado. Los resultados obtenidos sugieren la participación de más de un fotorreceptor en la integración de la señal de la luz en *T. atroviride*. Como se mostró en la Figura 7, los genes de *cry1* y *phr1* son regulados por *blr1* en luz blanca, y dicha regulación también se observó bajo condiciones de inducción con luz azul (Figura 13). El gen *cry1* además de ser regulado por *blr1*, también es regulado por *phr1*, ya que la remoción de *phr1* resulta en una reducción de la expresión del gen *cry1*, sugiriendo una regulación transcripcional entre los genes codificantes para DNA fotoliasas (Figura 13). Los genes *hsp20* son inducidos por luz azul y tal inducción se mantiene aún en mutantes Δ *blr1* sugiriendo que otros sistemas de percepción de luz podrían participar en la regulación de su expresión. El análisis de expresión de estos genes en las mutantes Δ *phr1* y Δ *cry1* mostró que la inducción del gen *hsp20-1* se mantuvo en ambas cepas. Sin embargo, la expresión del gen *hsp20-2* parece depender de *phr1* ya que solo la remoción de *phr1* resultó en una disminución de su expresión en la luz azul (Figura 13). Si bien la luz azul indujo la expresión de estos genes, la luz roja tuvo un efecto aún mayor. Curiosamente, el análisis de expresión de los genes *hsp20-1* y *hsp20-2* en las mutantes Δ *blr1*, Δ *phr1* y Δ *cry1* resultó en una considerable reducción de su expresión en luz roja. Adicionalmente en el gen *fads1*, el cual se indujo por luz roja, también observamos una disminución en su expresión en las cepas Δ *phr1* y Δ *cry1* en luz roja (Figura 13). El análisis de expresión en las mutantes Δ *blr1*, Δ *phr1* y Δ *cry1* mostró que *blr1* no altera la expresión del gen *fads1* tras la exposición a luz roja, sin embargo, la delección de *phr1* o *cry1* da lugar a una disminución de la expresión de dicho gen en luz roja (Figura 13). La expresión de los genes *cpa1* y *gp-1* también fue alterada en las cepas Δ *blr1*, Δ *phr1* y Δ *cry1* después de la inducción con luz roja. La expresión del gen *gp-1* fue alterada en la misma magnitud en las tres mutantes

mientras que la expresión del gen *cpa1* fue alterada a diferente nivel en cada cepa mutante tras la exposición a luz roja (Figura 13). En conjunto estos datos muestran que los genes *blr1*, *phr1* y *cry1* codificantes de potenciales fotorreceptores de luz azul son necesarios para la apropiada regulación de los genes *hsp20-1*, *hsp20-2*, *fads1*, *cpa1* y *gp-1* bajo condiciones de inducción con luz roja. Por otro lado el análisis de expresión de los genes *fads1*, *gp-1* y *cpa1* en luz azul, mostró que estos genes son regulados principalmente por *blr1* y en menor extensión por *phr1* y *cry1*.

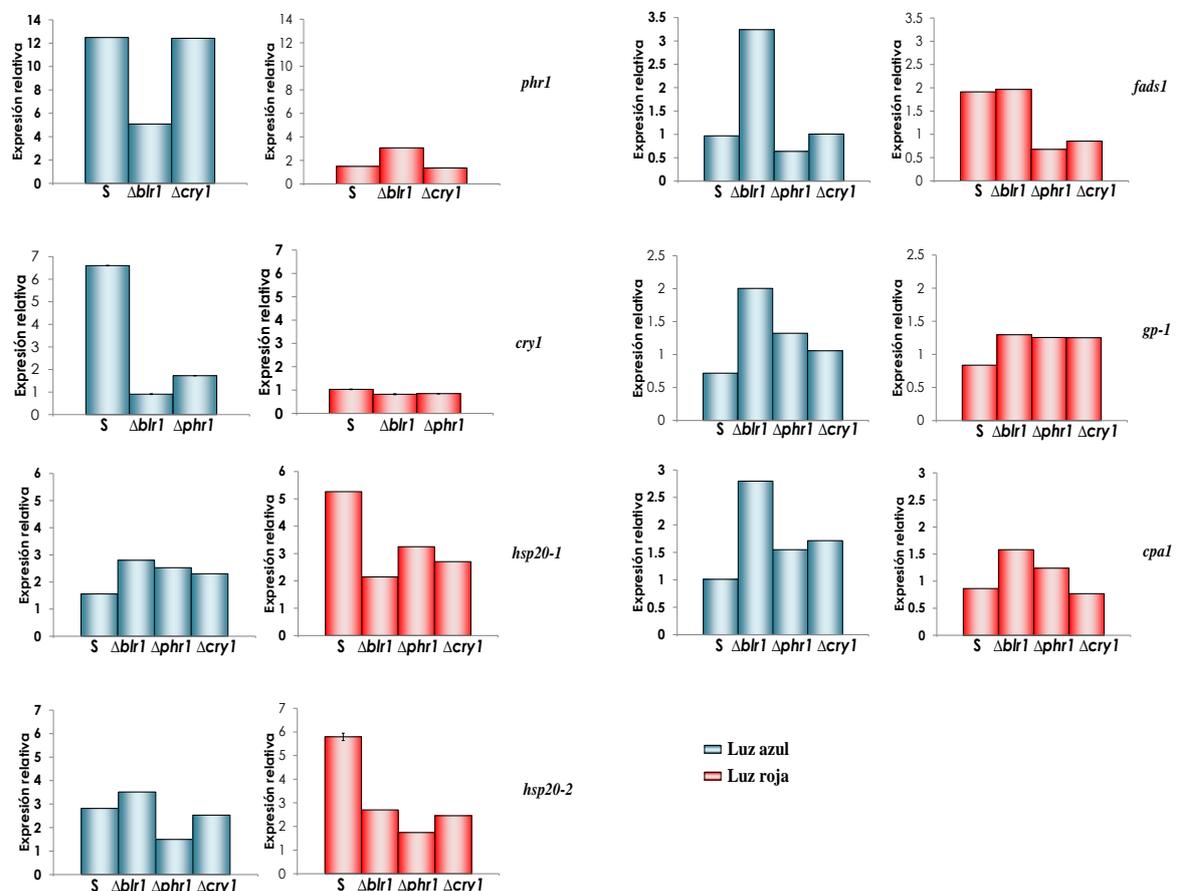


Figura 13. Efecto de la luz roja o azul sobre la acumulación de transcritos en mutantes de potenciales receptores de luz azul. El RNA total fue extraído a partir de las cepas silvestre (S), $\Delta cry1$, $\Delta phr1$ y $\Delta blr1$ crecidas en oscuridad o después de la exposición a un pulso de luz azul o roja ($1200 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) para el análisis de expresión de genes. Los niveles de transcrito fueron

determinados mediante RT-qPCR usando como gen de referencia al gen *gpd*. Los niveles de expresión son relativos a la expresión en la oscuridad. Las gráficas muestran el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar.

Los resultados obtenidos con luz roja o azul sugieren la participación de un sistema sensor de luz roja. Hasta la realización de este trabajo y escritura de la tesis, se tenía el dato de que en el genoma de *T. atroviride* existía un solo gen que codificaba un fitocromo (*phy1*). Sin embargo, durante la conclusión de ésta tesis fue identificado un segundo gen fitocromo (*phy2*). En el laboratorio contamos con dos aislados de la mutante $\Delta phy1$: M11 y M21 (la mutante $\Delta phy1$ tiene una remoción parcial del gen *phy1*, dicha mutante conserva aproximadamente 1.4 kb del marco de lectura del gen *phy1* hacia el extremo 5'). La luz roja/roja lejana posee longitudes de onda largas y un contenido energético mucho menor al de la luz azul/UV, por lo que la célula no interpreta de la misma manera estos tipos de radiaciones. La luz de longitudes de onda largas se suele asociar a vibraciones moleculares productoras de calor. Los genes *hsp20-1* y *hsp20-2* son proteínas de choque térmico, y es probable que la célula asociara la exposición a luz roja con un estrés por temperatura y se protegiera induciendo la expresión de dichos genes. Con la idea de esclarecer la participación de un fitocromo en la percepción de la luz roja se realizaron ensayos de expresión de algunos genes en mutantes $\Delta phy1$ (M11 y M21) expuestas a la luz roja. Sin embargo, no hubo una diferencia clara en los niveles de expresión respecto a la cepa silvestre. Alternativamente y dado que en el laboratorio se tiene el antecedente de un efecto de la luz roja lejana y la temperatura sobre el crecimiento de *T. atroviride*, se realizaron ensayos de expresión en las mutantes M11 y M21 bajo dichas condiciones de luz y temperatura; sin embargo, los resultados fueron muy variables y no fueron consistentes entre las mutantes, lo cual imposibilitó obtener información sobre la participación de *phy1* en la regulación de la expresión de genes regulados por la luz en *T. atroviride*.

9. DISCUSIÓN.

En este trabajo se analizó la participación de potenciales fotorreceptores en las principales respuestas a luz observadas en *T. atroviride*. Se demostró que el gen *cry1* es claramente inducido por la luz blanca o la luz azul a través de Blr1. El hecho de que la inducción de la expresión del gen *cry1* haya sido más fuerte en la luz azul que en la luz blanca, y que las luces roja y verde hayan tenido un efecto ligeramente negativo sobre su expresión sugiere, que además de Blr1, otros fotorreceptores pueden participar en la integración de la señal de la luz para obtener la respuesta observada en la luz blanca. En contraste, la expresión de los genes *cry-DASH* y *ops* no pudo ser detectada bajo ninguna de las condiciones de luz usadas en los experimentos. Es probable que dichos genes se expresen bajo otras condiciones, tales como un estado del desarrollo particular, o en respuesta a otras longitudes de onda de luz. También es posible que bajo tales condiciones ejerzan su función biológica ya que la delección de dichos genes no tuvo fenotipo aparente bajo las condiciones experimentales usadas. Previamente se ha mostrado que la luz tiene un efecto negativo sobre el crecimiento y éste es regulado por las proteínas Blr (Casas-Flores *et al.* 2004). En las cepas mutantes $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$ la luz azul tiene un mayor efecto de inhibición del crecimiento que en la cepa silvestre, sugiriendo que otro sistema de percepción de la luz azul puede participar en el efecto negativo de la luz sobre el crecimiento micelial (Casas-Flores *et al.* 2004). La remoción de los genes *cry-DASH* u *ops* no afectó de manera significativa el

crecimiento micelial en *T. atroviride*, sugiriendo que Blr1 permanece como el principal fotorreceptor en la regulación del crecimiento. Sin embargo, en la cepa $\Delta cry1$ se pudo observar un ligero, pero estadísticamente significativo, incremento del crecimiento en luz azul respecto a la cepa silvestre, sugiriendo que *cry1* podría participar sutilmente en la regulación del crecimiento micelial por la luz en *T. atroviride*. Sin embargo, una diferencia estadísticamente significativa no necesariamente implica que sea biológicamente significativa. Por otro lado, ninguna de las tres mutantes $\Delta cry1$, $\Delta cry-DASH$ o Δops , resultaron afectadas en la fotoconidiación. La luz verde no tuvo efecto sobre la fotoconidiación o el crecimiento y esto no fue alterado por la remoción del gen *ops*. Las CPD fotoliasas han sido identificadas en varios organismos tanto procariotas como eucariotas. En contraste, las 6-4 fotoliasas han sido identificadas solo en un pequeño grupo de eucariotes (Sinha y Häder 2002). Sin embargo, recientemente se identificó una 6-4 fotoliasa en *Agrobacterium tumefaciens* y se propuso que las 6-4 fotoliasas están ampliamente distribuidas en procariotas (Zhang y col., 2013). La presencia de genes codificantes de 6-4 fotoliasas en los genomas de hongos es reducida, y su papel ha sido poco estudiado. Hasta ahora hay solo tres estudios del papel de las 6-4 fotoliasas en hongos: en *C. zea-maydis* (Bluhm y Dunkle 2008); en *T. reesei* (Guzmán-Moreno y col., 2014) y en *Ustilago maydis* (Brych y col., 2015). En *C. zea-maydis*, se identificó un gen 6-4 fotoliasa (*ph11*), cuya remoción condujo a anomalías en el desarrollo y en el metabolismo secundario, así como también a una drástica reducción de la fotorreactivación *in vivo* (Bluhm y Dunkle 2008). En *T. reesei* se identificó un gen criptocromo/6-4 fotoliasa (*cry1*). En este caso, la falta del gen *cry1* dio lugar a una reducción en la fotorreparación *in vivo*, mientras que la sobreexpresión de dicho gen promovió un incremento en la reparación del daño en el DNA respecto a la cepa silvestre en la oscuridad. Esto sugiere, que *cry1* puede regular sistemas de reparación independientes de la luz (Guzmán-Moreno y col., 2014). En *U. maydis*, se identificó un gen 6-4 fotoliasa (*phr2*), la remoción de dicho gen dio lugar a una reducción en la fotorreactivación de *U. maydis*, además, en

una doble mutante en los genes *phr1* (CPD-fotoliasa) y *phr2*, la capacidad de fotorreactivación se perdió completamente (Brych y col., 2015). En este trabajo se demostró que la 6-4 fotoliasa de *T. atroviride* (*Cry1*) es esencial para una fotorreactivación total *in vivo*. Además, el análisis transcripcional demostró que hay una regulación interdependiente entre genes de DNA fotoliasas, ya que la remoción de *cry1* redujo considerablemente la expresión de *phr1* y viceversa, lo cual apoya la idea de la necesidad de la presencia de ambos genes (*cry1* y *phr1*) funcionales para una total fotorreactivación *in vivo*. La reducción observada en el porcentaje de sobrevivencia de la cepa $\Delta cry1$ es consistente con una alta eficiencia de Phr1 en la fotorreparación y con el hecho de que los CPDs son el principal tipo de daño provocado por la luz UV al DNA. La remoción del gen *cry1* claramente afectó la habilidad de *T. atroviride* para fotorreactivar. El efecto de la remoción de *cry1* no solo se observó en la reparación del daño al DNA dependiente de la luz, sino que, en la oscuridad, la sobrevivencia de las cepas $\Delta cry1$ y $\Delta phr1$ disminuyó aproximadamente un 50% respecto a la cepa silvestre. Esto sugiere que las DNA fotoliasas de *T. atroviride* no solo son necesarias para la fotorreactivación, sino también son necesarias para la tolerancia a UVC en la oscuridad. En este sentido, se ha descrito que, en ausencia de luz necesaria para la fotorreactivación, las DNA fotoliasas se unen al DNA dañado y estimulan los sistemas de reparación de DNA independientes de la luz, específicamente el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (Sancar y Smith 1989). La remoción del gen *blr1* resultó en una drástica reducción de la fotorreactivación *in vivo*, mientras que la sobreexpresión del gen *blr2* promovió un incremento significativo en la fotorreactivación, sugiriendo que ambos Blr1 y Blr2 regulan la fotorreactivación a través del control transcripcional de *phr1* y *cry1*. Sin embargo, una pequeña sobrevivencia fue observada en la luz con respecto a la oscuridad en la cepa $\Delta blr1$, lo cual sugiere otro medio de regulación de los genes de fotoliasas o el involucramiento de otro sistema en la resistencia a UVC. A partir de los datos de secuenciación 454 previamente obtenidos en nuestro laboratorio, se identificaron varios genes

pertencientes a otros sistemas de reparación sugiriendo que otros sistemas de reparación pueden ser activados y operar en respuesta a la luz. Sin embargo, estos genes son inducidos por la luz blanca de manera dependiente de *blr1*, descartando su participación en la sobrevivencia observada en la cepa $\Delta blr1$ en la luz. Los resultados obtenidos en la cepa $\Delta blr1$ respecto a fotorreactivación concuerdan con los obtenidos en un estudio realizado en el hongo *U. maydis*. En este hongo la remoción del gen *wco1* (ortólogo de *wc-1* de *N. crassa*) dió lugar a una fuerte reducción en la sobrevivencia en luz de la cepa $\Delta wco1$ expuesta a luz UV-B con respecto a la cepa silvestre, sin embargo, la cepa $\Delta wco1$ mostró un incremento en la sobrevivencia en luz comparado a la oscuridad en la cepa $\Delta wco1$ indicando que su capacidad total para sobrevivir al tratamiento con UV-B es reducida pero no completamente eliminada y que esto probablemente se debió a una inducción residual de *phr1* en la cepa $\Delta wco1$ (Brych y col., 2015). Recientemente, miembros de la familia criptocromo/fotoliasa con una función dual en reparación del daño al DNA y en procesos de señalización han comenzado a ser identificados, específicamente en el control de la expresión de genes (Berrocal-Tito y col., 2007; Bayram y col., 2008; Bluhm y Dunkle 2008; Coesel y col., 2009; von Zadow y col., 2016).

En este trabajo se evaluó la participación de *cry1* en la regulación transcripcional en *T. atroviride* analizando la expresión de genes independientes de *blr1* en la cepa $\Delta cry1$. Con el fin de conocer la longitud de onda que induce o reprime los genes independientes de *blr1*, se analizó la expresión de cinco genes mediante RT-qPCR, a partir de micelio expuesto a la luz roja o azul. Sin embargo, no fue posible asignar su regulación por luz de una longitud de onda particular, ya que ambas longitudes de onda (luz roja y azul) afectaron la expresión de los genes analizados. Estas observaciones sugieren que los fotorreceptores de luz roja y azul actúan juntos para regular la expresión de estos genes. En este sentido se ha sugerido que, en *N. crassa*, los fotorreceptores Cry-1, Nop-1 y Phy-2 modulan la actividad del complejo WC, probablemente a través de la activación dependiente de luz de un supuesto represor del complejo WC (Olmedo y

col., 2009). Además, en *A. nidulans* se ha demostrado que hay una interacción física entre los sensores de luz azul LreA y LreB y los sensores de luz roja FphA, sugiriendo que la percepción de luz roja y azul ocurre en el mismo complejo proteico (Purschwitz y col., 2008). Por otro lado, recientemente se ha identificado en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* un criptocromo similar a los criptocromos de animales (aCRY), el cual regula la expresión de varios genes en respuesta a luz azul y roja, sugiriendo que aCRY no solo funciona como un receptor de luz azul, sino también como un receptor de luz roja (Beel y col., 2012). Por otro lado, además de la idea de sistemas sensores de luz actuando en conjunto, se ha sugerido una relación entre sistemas sensores de luz y rutas sensoras de estrés para la regulación de la expresión de genes. En este sentido, recientemente se ha sugerido en *T. atroviride* que la luz regula la reproducción asexual y la expresión de genes a través de la MAPK *Tmk3*, y que dicha MAPK es inducida por luz azul de una manera dependiente de *Blr1* (Esquivel-Naranjo y col., 2016). Así mismo, se ha sugerido que el fitocromo *FphA* de *A. nidulans* interactúa físicamente con la proteína *YpdA* (histidina fosfotransferasa) y causa la fosforilación dependiente de luz de la MAPK *SakA*, la cual fosforila factores de transcripción río abajo de la cascada de señalización con la consecuente regulación de la expresión génica (Yu y col., 2016). El análisis de expresión en las cepas $\Delta blr1$, $\Delta phr1$ y $\Delta cry1$, claramente muestra que los receptores potenciales de luz azul están involucrados en el control de la expresión de genes tanto en la luz roja como en la luz azul en *T. atroviride*. La remoción de estos genes favorece un incremento en la expresión del gen *gp-1* en luz roja, sugiriendo que, de alguna manera *cry1*, *phr1* y *blr1* regulan negativamente la expresión del gen *gp-1* en luz roja. La percepción de luz roja probablemente ocurra vía un fitocromo, y en ausencia de *blr1*, *phr1* o *cry1*, el receptor de luz roja podría conducir a un incremento en la expresión del gen *gp-1*. La expresión de los genes *hsp20-1* y *hsp20-2* es considerablemente reducida en las cepas $\Delta blr1$, $\Delta phr1$ y $\Delta cry1$ en luz roja. Sin embargo, el hecho de que ellos mantengan una ligera inducción de su expresión sugiere que parte de la ruta de activación para la percepción de

luz roja permanece activa. Blr1 no es necesario para la inducción de *fads1* en luz roja y Cry1 no es necesario para la represión de *cpa1* en luz roja. En conjunto estos datos sugieren que Blr1, Phr1 y Cry1 están involucrados en la regulación de la expresión de genes en luz roja, pero que la percepción de luz roja no tiene lugar directamente a través de estos fotorreceptores potenciales (Figura 14). Es probable que un fitocromo sea responsable de la percepción de la luz roja, y que junto con los receptores potenciales de luz azul contribuyan a la regulación de la expresión en luz roja como recientemente se ha descrito en *A. nidulans* (Hedtke y col., 2015). Si bien se realizó un análisis de expresión de genes en la cepa $\Delta phy1$, éste no nos permitió concluir sobre su participación en la regulación génica. Adicionalmente, durante la escritura de esta tesis, se identificó un segundo gen que codifica para un fitocromo (*phy2*) en *T. atroviride*, la delección de *phy2* no mostró ningún fenotipo aparente en respuesta a luz (datos no publicados), por lo que, sería necesario realizar ensayos de expresión génica en una cepa doble mutante de los genes *phy1* y *phy2* a fin de esclarecer el papel del fitocromo en la regulación génica.

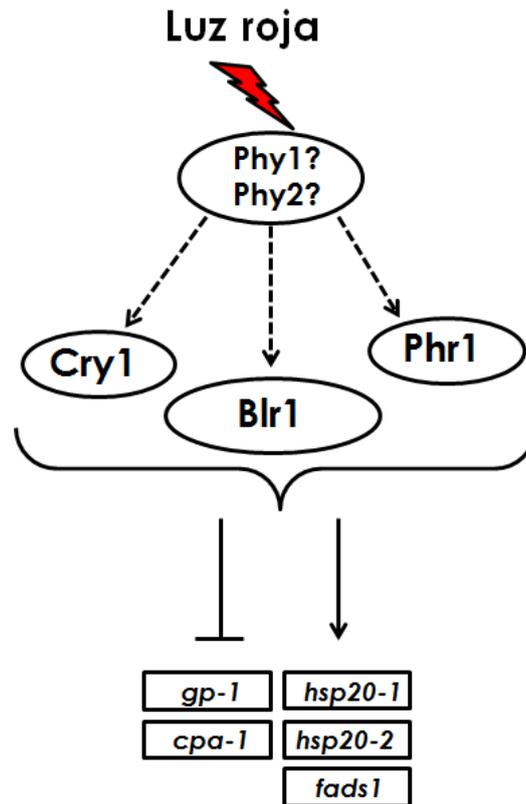


Figura 14. Modelo hipotético para la regulación de la expresión génica en la luz roja en *T. atroviride*. Dado que la expresión de genes regulados por la luz se vio alterada en mutantes de los potenciales receptores de luz azul bajo condiciones de inducción con luz roja, se sugiere que los sistemas de percepción de luz azul y roja podrían interactuar para regular la expresión génica. Probablemente Phy1, Phy2 o ambos tras percibir la luz roja interaccionen de alguna manera con Blr1, Cry1 o Phr1 para inducir o reprimir la expresión de los genes *hsp20-1*, *hsp20-2*, *fads1*, *gp-1* y *cpa1*. Las líneas punteadas indican interacciones hipotéticas entre Cry1, Blr1 y Phr1 con Phy1 y/o Phy2; las líneas perpendiculares indican regulación negativa de la expresión génica y las flechas indican regulación positiva de componentes de la ruta o de la expresión génica.

El análisis de expresión después de la inducción con luz azul mostró que la remoción de *blr1* favorece un incremento en la inducción de la expresión

de algunos de los genes analizados, sugiriendo, que en la ausencia de *blr1*, un fotorreceptor de luz azul es liberado de un efecto negativo ejercido por Blr1 para regular la expresión de los genes (Figura 15). En el caso particular del gen *hsp20-2*, el otro fotorreceptor de luz azul puede ser Phr1 ya que su remoción disminuye significativamente la expresión de *hsp20-2*. Sin embargo, también puede ser que Phr1 esté activando otro fotorreceptor requerido para la inducción de la expresión del gen *hsp20-2*. La represión por luz azul de los genes *cpa1*, *gp-1* y *fads1* fue claramente dependiente de *blr1*. Sin embargo, el aumento en la expresión de estos genes en la cepa $\Delta blr1$ respecto a la cepa silvestre sugiere la participación de otro sistema de percepción de luz azul. El análisis de la expresión de los genes *hsp20-1*, *gp-1* y *cpa1* en luz azul mostró que las remociones de los genes *blr1*, *phr1* o *cry1* dan lugar a un comportamiento similar (incremento en la inducción), pero de diferente magnitud entre las cepas analizadas. Tomando juntos, estos datos sugieren que además de los fotorreceptores potenciales evaluados, otro sistema de percepción de luz azul podría estar involucrado en la regulación de la expresión de algunos genes que responden a la luz. Además, dado el comportamiento de las cepas $\Delta blr1$, $\Delta phr1$ y $\Delta cry1$ (fotorreceptores potenciales de luz azul) bajo condiciones de inducción con luz roja en la expresión de los genes analizados, es probable que los sistemas sensores de luz roja y azul interactúen en alguna forma para dar la respuesta transcripcional observada en la cepa silvestre. Previamente, Purschwitz y col., (2008) y Olmedo y col., (2009) sugieren que en *A. nidulans* y *N. crassa* respectivamente, los receptores de luz roja y azul interactúan físicamente para regular procesos fisiológicos dependientes de luz. Adicionalmente, de acuerdo a datos ya publicados (Esquivel-Naranjo y col., 2016, y Yu y col., 2016), los sistemas sensores de luz roja y azul interactúan con componentes de las rutas sensoras de estrés y, en conjunto, coordinan la actividad transcripcional observada en luz. Aunque los datos sugieren la participación de otro sistema de percepción de luz azul además de los evaluados en este estudio, se necesitan nuevas pruebas que incluyan el uso de dobles y triples mutantes para obtener evidencias más concluyentes sobre la participación

de otro receptor de luz azul. Por otro lado, ya que la luz azul induce la producción de ROS, es probable que un mecanismo que involucre ROS y no necesariamente un fotorreceptor podría ser el responsable de la respuesta transcripcional observada (Figura 15).

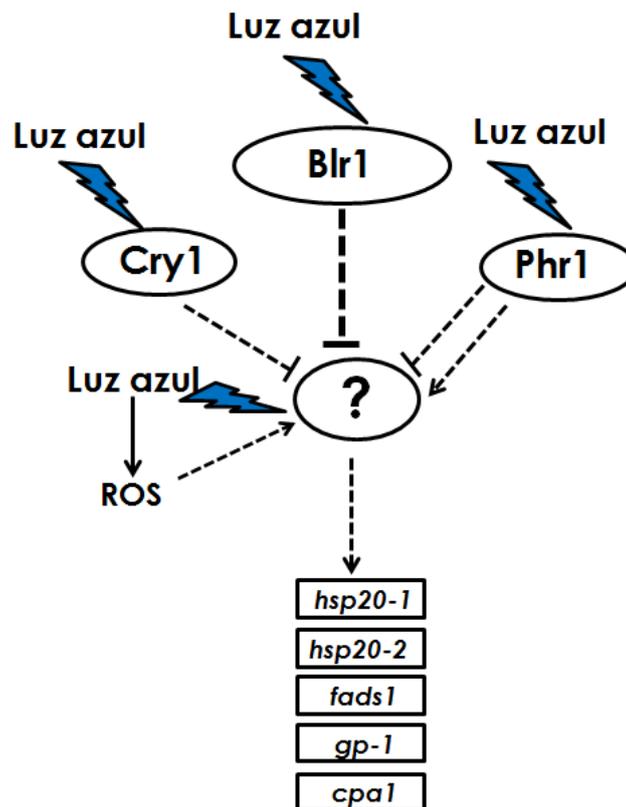


Figura 15. Modelo hipotético para la regulación de la expresión génica en la luz azul en *T. atroviride*. La remoción de Blr1, Cry1 o Phr1 dio lugar a alteraciones de la expresión de los genes analizados bajo condiciones de inducción con luz azul, dichas alteraciones en la mayoría de los genes fue un aumento en su expresión sugiriendo, que en ausencia de Blr1, Cry1 o Phr1 algún componente no identificado (indicado como (?)) en la figura) podría ser directa o indirectamente activado por la luz para inducir la expresión de los genes *hsp20-1*, *hsp20-2*, *fads1*, *gp-1* y *cpa1* bajo la luz azul. Las líneas punteadas indican interacciones hipotéticas entre Cry1, Blr1 y Phr1 con el componente no identificado de la ruta; las perpendiculares indican

regulación negativa y las flechas indican regulación positiva de componentes de la ruta o de la expresión génica.

10. CONCLUSIONES.

- ✓ Los genes *ops*, *cry1* y *cry-DASH* no participan en la regulación del crecimiento micelial o fotoconidiación en *T. atroviride*.
- ✓ La expresión del gen *cry1* es inducida por luz en una manera dependiente de *blr1* y *phr1*.
- ✓ Hay una regulación interdependiente en los genes de DNA fotoliasas *cry1* y *phr1* para su total inducción en luz blanca.
- ✓ *Cry1* y *Phr1* son necesarias para una fotorreactivación total *in vivo* y para la tolerancia a UVC en oscuridad.
- ✓ *Blr1* y *Blr2* regulan la fotorreactivación a través del control transcripcional de los genes *cry1* y *phr1*.
- ✓ La luz roja o azul inducen o reprimen la expresión de genes independientes de *blr1*.
- ✓ Además de su actividad en la fotorreactivación, *Cry1* regula la expresión de genes independientes de *blr1* tanto en luz roja como en luz azul sugiriendo que los receptores de luz roja y azul interactúan para dar la respuesta transcripcional observada.

11. PERSPECTIVAS

- ✓ Sería importante analizar la expresión de los genes *cry-DASH* y *ops* bajo otras condiciones de inducción a fin de saber si estos genes realmente se expresan en *T. atroviride*.
- ✓ Generar dobles o triples mutantes en potenciales fotorreceptores incluyendo los genes *ops*, *phy* y *envoy*, otro fotorreceptor que no fue incluido en este trabajo, a fin de descartar redundancia de funciones. Alternativamente se podrían generar sobreexpresantes que nos pudieran permitir observar una respuesta fenotípica más clara en las respuestas a la luz.
- ✓ Realizar ensayos de fotorreactivación *in vitro* a fin de confirmar la actividad de 6-4 fotoliasa del gen *cry1*. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que *cry1* es necesario para la fotorreactivación apoyando su función de DNA fotoliasa sin embargo, su especificidad como 6-4 DNA fotoliasa podría establecerse mediante ensayos específicos con la proteína Cry1 purificada.
- ✓ Dado que los resultados sobre el análisis de expresión de genes responsivos a luz sugieren la participación de un fitocromo en la percepción de luz roja, sería importante generar mutantes completas en el gen *phy1* o *phy2* y repetir los análisis de la expresión con los genes evaluados en este trabajo en las mutantes generadas.

12. BIBLIOGRAFIA.

Ahmad, M., Cashmore, A. R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366: 162-166.

Ballario, P., Victorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A., Macino, G. (1996). White collar-1 a central regulator of blue Light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.*, 15: 1650-1657.

Bayram, Ö., Biesemann, Ch., Krappmann, S., Galland, P., Braus, G. (2008). More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular Biology of the cell.*, 19: 3254-3262.

Beel B, Prager K, Spexard M, Sasso S, Weiss D, Müller N, Heinnickel M, Dewez D, Ikoma D, Grossman AR, Kottke T, Mittag M. (2012). A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, **24**: 2992-3008.

Berrocal-Tito, G. M., Rosales-Saavedra, T., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A. (2000). Characterization of Blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochemistry and Photobiology*, 71 (5): 662-668.

Berrocal-Tito, G. M., Esquivel Naranjo, E. U., Horwitz, B. A., Herrera Estrella, A. (2007). *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryotic Cell*, 1682-1692.

Bieszke, J. A., Braun, E. L., Bean, L. E., Kang, S., Natvig, D. O., Borkovich, K. A. (1999). The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 8034-8039.

Bieszke JA, Li L. (2007). The fungal opsin gene *nop-1* is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, **52**: 149-157.

Bluhm, B. H., Dunkle, L. D. (2008). PHL1 of *Cercospora zea-maydis* encodes a member of the photolyase/cryptochrome family involved in UV protection and fungal development. *Fungal Genetics and Biology*, **45**: 1364-1372.

Brown, L.S. (2004). Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions. *Photochemical and Photobiological sciences*, **3**: 555-65.

Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T. (2003). Identification of a new cryptochrome class: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Cell*, **11**: 59-67.

Brych, A., Mascarenhas, J., Jaeger, E., Charkiewicz, E., Pokorny, R., Bölker, M., Doehlemann, G., Batschaver, A. (2015). White collar 1-induced photolyase expression contributes to UV-tolerance of *Ustilago maydis*. *Microbiology Open*, **5**(2):224-243.

Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., Herrera-Estrella, A. (2004). BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelia growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, **150**: 3561-3569.

Casas-Flores, S., Herrera-Estrella, A. (2016). The Bright and Dark Sides of Fungal Life. *Environmental and Microbial Relationships*, 3rd Edition, *The Mycota IV*, 41-47.

Castrillo M, García-Martínez J, Avalos J. (2013). Light-dependent functions of the *Fusarium fujikuroi* CryD DASH cryptochrome in development and secondary metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**: 2777-2788.

Chovanec, P., Hudecova, D., Varecka L'. (2001). Vegetative Growth, Aging- and Light-induced conidiation of *Trichoderma viride* Cultivated on Different Carbon Sources. *Folia Microbiol.* 46:417-422.

Coesel S, Mangogna M, Ishikawa T, Heijde M, Rogato A, Finazzi G, Todo T, Bowler C, Falciatore A. (2009). Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. *EMBO Reports* **10**: 655-661.

Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **69**: 2110-2114.

Corrochano LM, Garre V. (2010). Photobiology in the Zygomycota: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genetics and Biology*, **47**: 893-899.

Esquivel-Naranjo EU, Herrera-Estrella A. (2007). Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by *blr-2* overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, **153**: 3909-3922.

Esquivel-Naranjo EU., García-Esquivel M., Medina-Castellanos E., Correa-Pérez VA., Parra-Aguirre JL., Landeros-Jaime F., Cervantes-Chávez JA., Herrera-Estrella A. (2016). A *Trichoderma atroviride* stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals. *Molecular Microbiology*, **5**: 860-76.

Fraikin, G. Ya., Strakhovskaya, M. G., Rubin, A. B. (2013). Biological photoreceptors of Light-Dependent regulatory Process. *Biochemistry (Moscow)*, 78:1238-1253.

Friedl M, Schmoll M, Kubicek C, Druzhinina I. (2008). Photostimulation of *Hypocrea atrovirides* growth occurs due to a cross-talk of carbon metabolism, blue light receptors and response to oxidative stress. *Microbiology*, **154**: 1229-1241.

Froehlich A.C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J., Dunlap, J. C.(2005). Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 4: 2140-52.

Froehlich A, Chen Ch, Belden W, Madeti C, Roenneberg T, Merrow M, Loros J, Dunlap J. (2010). Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, **9**: 738-750.

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. *Scientific reports*, 5: 7798-7808.

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**: 100625-37.

Hedtke M, Rauscher S, Röhrig J, Rodriguez J, Yu Z, Fischer R. (2015). Light-dependent Gene Activation in *Aspergillus nidulans* is strictly dependent on phytochrome and involves the interplay of phytochrome and white-collar-regulated Histone H3 acetylation. *Molecular Microbiology*, **97**: 733–745.

Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M., Todo, T. (2000). Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. Pcc6803. *Nucleic acids research*, 28: 2353-62.

Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A. (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Molecular Microbiology*, 64: 5-15.

Idnurm A, Verma S, Corrochano L. (2010). A glimpse into the basis of vision in the kingdom mycota. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 881-892.

Jones, J., Dunsmuir, P., Bedbrook, J. (1985). High levels expression of induced chimeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.*, 4: 2411-2418.

Kong, Sam-Geun, Okajima K. (2016). Diverse photoreceptors and light responses in plants. *J. Plant. Res.*, 129:111-114.

Lin, Ch., Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biology*, 6: 220.

Linden H., Macino G. (1997). White collar 2 a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J.*, 16: 98-109.

Olmedo M, Ruger-Herreros C, Luque EM, Corrochano LM. (2009). A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes con-10 and con-6 in *Neurospora crassa*. *Fungal and Genetics Biology*, 47: 352-363.

Purschwitz J, Muller S, Kastner C, Schöser M, Haas H, Espeso EA, Atoui A, Calvo AM, Fischer R. (2008). Functional and physical interaction of blue and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*, 18: 255-259.

Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, Ch., Fischer, R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 566-571.

Qiu, L., Wang, JJ., Chu, ZJ., Ying, SH., Feng, MG. (2014). Phytochrome controls conidiation in response to red/far-red light and daylight length and regulates multistress tolerance in *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 16(7):2316-2328.

Raeder, U., Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Let. Appl. Microbiol.*, 1: 17-20.

Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Müller S, Fischer R. (2010). Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annual Review of Microbiology*, 64: 585-610.

Rosales-saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E. U., Casas-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C., Herrera-Estrella, A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology*, 152: 3305-3317.

Sancar GB, Smith FW. (1989). Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 4767-4776.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmoll M, Esquivel-Naranjo EU, Herrera-Estrella A. (2010). *Trichoderma* in the light of day- physiology and development. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 909-916.

Schwerdfeger, C., Linden, H. (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *The EMBO journal*, 20: 4846-4855.

Selby, Ch. P., Sancar A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *PNAS*, 103: 17696-17700.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 21-43.

Sinha RP, Häder DP. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1: 225-236.

Tagua, VG., Pausch, M., Eckel, M., Gutiérrez, G., Miralles-Durán, A., Sanz, C., Eslava, AP., Pokorny, R., Corrochano, LM., Batschauer, A. (2015). Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 112(49):15130-15135.

Van Der Horst, M. A., Hellingwerf, K. J. (2004). Photoreceptor proteins, "Star actors of modern times": A review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc. Chem. Res.*, 37: 13-20.

Veluchamy, S., Rollins, J. A. (2008). A CRY-DASH-type photolyase/cryptochrome from *Sclerotinia sclerotiorum* mediates minor UV-A-specific effects on development. *Fungal Genetics and Biology*, 1-12.

von Zadow, A., Ignatz, E., Pokorny, R., Essen, LO., Klug, G. (2016). *Rhodobacter sphaeroides* CryB is a bacterial cryptochrome with (6-4) photolyase activity. *The FEBS Journal*, 283:4291-4309.

Wang, H. (2005). Signaling mechanisms of higher plant photoreceptors: A structure-function perspective. *Current topics in developmental biology*, 68: 227-261.

Wang, F., Song, X., Dong, X., Zhang, J., Dong, C. (2017). DASH-type cryptochromes regulate fruiting body development and secondary metabolism differently than CmWC-1 in the fungus *Cordyceps militaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101(11):4645-4657.

Wang, Z., Li, N., Li, J., Dunlap, J. C., Trail, F., Townsed, J. P. (2016). The Fast-Evolving phy-2 Gene Modulates Sexual Development in Response to light in the Model Fungus *Neurospora crassa*. *mBio*, 7: 2148-59.

Yu, J., Hamari, Z., Han, K., Seo, J., Reyes-Domínguez, Y., Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 41: 973-981.

Yu, Z., Armant, O., Fischer, R. (2016). Fungi use the SakA/HogA pathway for phytochrome-dependent light signaling. *Nature microbiology*, 1: 16019.

Yu, Z., Fischer, R. (2018). Light sensing and responses in fungi. *Nature Reviews Microbiology*.

Zhang, F., Vierock, J., Yizhar, O., Fenno, L. E., Tsunoda, S., Kianianmomeni, A., Prigge, M., Berndt, A., Cushman, J., Polle, J., Magnuson, D., Hegemann, P., Deisseroth, K. (2011). The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell*, 147: 1446-57.

Zhang F, Scheerer P, Oberpichler I, Lamparter T, Krauß N. (2013). Crystal

structure of a prokaryotic (6-4) photolyase with an Fe-S cluster and a 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine antenna chromophore. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **110**: 7217-7222.

13. ANEXOS.

Anexo 1. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

- A. Oligonucleótidos usados en la obtención de las construcciones para la remoción de los genes *cry1*, *cry-DASH* y *ops*, y para la identificación de mutantes.**

| OLIGONUCLEOTIDO | SECUENCIA | OBSERVACIONES |
|-----------------|--|---|
| cry1p-F | CGT AGT CCG CTC TGC CTG | Oligonucleótidos usados para amplificar el fragmento 5' de la construcción para la delección del gen <i>cry1</i> . |
| qcry1p-R | CTC CTT CAA TAT CAG TTA ACG TCG ATC ATG CAG TCA ACA ATT CAA AAG ATG G | |
| qcry1t-F | CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG TGA GGA AGA AGA CCA AGA AGA G | Oligonucleótidos usados para amplificar el extremo 3' de la construcción para la delección del gen <i>cry1</i> . |
| cry1t-R | GTA GTG CTG CCT GAA GAT GTC | |
| cry1-N5' | GGA TCC GCC AAG TGC CTT G | Oligonucleótidos "nest" usados para amplificar un fragmento interno de la construcción para la delección del gen <i>cry1</i> . |
| cry1-N3' | CCA CCA GAG GGT ATA AGT GAT G | |
| cryDASHp-F | CCA GTC AAC CTG CAA TCA GCT CC | Oligonucleótidos usados para amplificar el fragmento 5' de la construcción para la delección del gen <i>cryDASH</i> . |
| qcryDASHp-R | CTC CTT CAA TAT CAG TTA ACG TCG ATC CGA ATT CGT CTG GCC AAT GAG G | |
| qcryDASHt-F | CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG CTC CAA TCT CCC CCA AGG TTC | Oligonucleótidos usados para amplificar el extremo 3' de la construcción para la delección del gen <i>cryDASH</i> . |
| cryDASHt-R | CGA CAT GGA TGC CAC AAG ACA ATG G | |
| cryDASH-N3' | CCG AGC TGG CTT CGT CTA TAG G | Oligonucleótidos "nest" usados para amplificar un fragmento interno de la construcción para la delección del gen <i>cryDASH</i> . |
| cryDASH-N5' | GGA CGG GCT AGT ATT TGT CTC CG | |

| | | |
|---------------|--|---|
| pOPS-F | GTG AAG CAT TCG TCC CCA GC | Oligonucleótidos usados para amplificar el fragmento 5' de la construcción para la delección del gen <i>ops</i> . |
| qOPS-R | TGC TCC TTC AAT ATC AGT TAA CGT CGA TCA GCC GTG TTT AGG ATG TCG C | |
| qOPS-F | CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG TCA AGG CGT TAA GGA CTA TAC G | Oligonucleótidos usados para amplificar el extremo 3' de la construcción para la delección del gen <i>ops</i> . |
| tOPS-R | GCA GCG GTT GGT CGG AAG | |
| pOPS-nest-F | CAT GGC CAT TGC TAG AAG TGC | Oligonucleótidos "nest" usados para amplificar un fragmento interno de la construcción para la delección del gen <i>ops</i> . |
| tOPS-nest-R | GAC TTC CTC GTT CCC AAG ACC | |
| ORFOPS-F | <u>TCT AGA</u> CCA TGA CTT TAT TCC TCC GTG C | Oligonucleótidos usados en la identificación de las transformantes Δops . |
| ORFOPS-R | <u>AAG CTT CGT</u> CGT TCA ACA AGT TTA GAC AGT GG | |
| ORFcry1-r | AAG CTT GTC CTA TAG AGA ATT GCT CGT G | Oligonucleótido usado en la identificación de transformantes $\Delta cry1$. |
| ORFcry-DASH-F | TCT AGA GCT CAC TGC CAT CAC CAT GTC TG | Oligonucleótidos usados en la identificación de las |

| | | |
|---------------|--|---|
| ORFcry-DASH-r | GAT ATC CGG ATT CAA CGA TAA CGA GAG | transformantes Δ cryDASH. |
| CRH-r | CTATTCCTTTGCCCTCGG ACGAGTGCTGGG | Oligonucleótido usado en la identificación de transformantes. |

B. Oligonucleótidos usados para el análisis de expresión de genes independientes de *blr1*.

| OLIGONUCLEOTIDO | SECUENCIA |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| gpd-F | GGC TGC CGA TGG TGA GCT CAA GGG |
| gpd-R | GAG GTC GAG GAC ACG GCG GGA G |
| 2RT-302457-F (<i>phr1</i>) | CTG GCG AGA TTT TTA CAA GCA CG |
| 2RT-302457-R (<i>phr1</i>) | GTG ATT GAG CTG ACG CAT CGC AG |
| 1RT-86846-F (<i>cry1</i>) | CGA CTC GCC CGC CCT CCA AGC AGC |
| 1RT-86846-R (<i>cry1</i>) | GGA GTC TGA AAG GTC ATT TTG ACA GTC |
| RT-255394-F (<i>hsp20-1</i>) | CAC CGA GCG CAG CGT TGG C |
| 255394-R (<i>hsp20-1</i>) | GTT GAC AGC AAT GCG TCG CG |
| RT-301737-F (<i>hsp20-2</i>) | CCA AAT ACT GGC TCA CTG AGC GC |
| 301737-R (<i>hsp20-2</i>) | GAA CAC CGC AAT GCG ACG AG |
| RT-301733-F (<i>cpa1</i>) | GTC TTG TTC ACT CGT TCA CAG TGG |
| 301733-R (<i>cpa1</i>) | CGT TGC ATC TCC CAG TCC TAG G |
| RT-298116-F (<i>gp-1</i>) | CGT TAC CTT CAC GGG ATC AAG CGC |
| 298116-R (<i>gp-1</i>) | CGT AGT TGA CGG TAA CCG AGC CG |
| 296851-F (<i>fads1</i>) | ATG GCT ACC ACC ACC ACA GTC |
| RT-296851-R (<i>fads1</i>) | GGC CAT GGA GAT GGA CAC CTT GG |

C. Oligonucleótidos usados para obtener el cDNA de *cry1*, *phr1* y *cry-DASH* y generar las construcciones pCold-*cry1*, pCold-*phr1* y pCold-*cry-DASH*.

| OLIGONUCLEOTIDO | SECUENCIA | CARACTERISTICA |
|---------------------|--|---|
| KpnI-Cold-6-4cdna-F | GGT ACC ATG GCC AAA CCG CGA GTG ATA TAT TG | Se adicionó un sitio de restricción KpnI |

| | | |
|-------------------------|---|---|
| q-Cold-6-4cdna-R | CTG AAA GGT CAT TTT GAC AGT CTA GCA AAA ACT GCC ACC TAT TCA CTC CTC C | Oligonucleótido quimérico. |
| q-Cold-6-4cdna-F | GGA GGA GTG AAT AGG TGG CAG TTT TTG CTA GAC TGT CAA AAT GAC CTT TCA G | Oligonucleótido quimérico. |
| HindIII-Cold-6-4cdna-R | AAG CTT TTA TGT TTT CTG CTT CTT TGT CTT GGC | Se adicionó un sitio de restricción HindIII |
| NdeI-Cold-DASHcdna-F | CAT ATG ATG TCT GGC GGA TCC ATC TTG CTC | Se adicionó un sitio de restricción NdeI |
| q-Cold-DASHcdna-R | CAG TCT CGA TTT CGG GTA GCT GGA TGT CGT GCA GAA GAT ACT TCA CAT CAT AAA GCC G | Oligonucleótido quimérico. |
| q-Cold-DASHcdna-F | CGG CTT TAT GAT GTG AAG TAT CTT CTG CAC GAC ATC CAG CTA CCC GAA ATC GAG ACT G | Oligonucleótido quimérico. |
| XbaI-Cold-DASHcdna-R | TCT AGA TCA ACG ATA ACG AGA GTT GAA TCG AG | Se adicionó un sitio de restricción XbaI |
| BamHI-Cold-phr1cdna-F | GGA TCC ATG CTC GCG AGG AGC GTC TAT AC | Se adicionó un sitio de restricción BamHI |
| q-Cold-phr1cdna-R | GCA TAC TCG GGC TTG AAT GGC TTG TTC ATA CAG ACA TAT GGC CAG TTA ACC AAA ACG TG | Oligonucleótido quimérico. |
| q-Cold-phr1cdna-F | CAC GTT TTG GTT AAC TGG CCA TAT GTC TGT ATG AAC AAG CCA TTC AAG CCC GAG TAT GC | Oligonucleótido quimérico. |
| HindIII-Cold-phr1cdna-R | AAG CTT CTA GAT CCC TCT CTC CAG CCC G | Se adicionó un sitio de restricción HindIII |

Anexo 2.

The *Trichoderma atroviride* cryptochrome/photolyase genes regulate the expression of *blr1*-independent genes both in red and blue light.