

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.**

**“LAS MAPKs DE *Trichoderma atroviride* ESTÁN INVOLUCRADAS EN  
LA RESPUESTA METABÓLICA A DAÑO MECÁNICO Y MICOFAGIA”**

Tesis que presenta

**BIOL. KARINA ATRIZTÁN HERNÁNDEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

Director de Tesis

**DR. ALFREDO HERIBERTO HERRERA ESTRELLA**

Irapuato Gto. Agosto 2016



## **Agradecimientos:**

A CONACYT por la beca otorgada para mis estudios durante dos años, sin la cual la realización de este proyecto no hubiera sido posible.

Al Dr. Alfredo Herrera por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y por la confianza otorgada para realizar este proyecto.

A mi comité La Dra. Therese Markow por permitirme trabajar en su laboratorio y utilizar su cepario, así como por sus comentarios hechos durante los tutoriales realizados. Al Dr. Jorge Ibarra, por darme buenos consejos en cuanto a la realización de experimentos y por compartir su experiencia en su área conmigo. Al Dr. Luis Herrera por aceptar participar en mi comité de último momento y por los comentarios hechos para la realización de mi trabajo.

Al Dr. Robert Winkler, y a su estudiante Abigail Moreno por apoyarme en la realización de toda la parte metabólica en su laboratorio y por todas sus enseñanzas y su tiempo otorgado.

A mi familia que aunque viven lejos de mí, siempre han apoyado mis sueños y han estado conmigo.

A todos los integrantes del laboratorio 7 del LANGEBIO (Peter, Ramón, Edgar, Manuel, Martha, Emmy, Liz, y todos los que han pasado por el laboratorio durante estos dos años) por todos los momentos de diversión y distracción, por ser excelentes compañeros y amigos. Y por estar siempre disponibles para cualquier consulta.

A mis amigos (Gerardo, Kevin, Viví, Vla, Marisela, Jules) por compartir conmigo desde los primeros días de ingreso a esta institución y por conservar su amistad a pesar de tener líneas de investigación diferentes.

A Daniel por todo su cariño, apoyo, comprensión y compañía durante los momentos difíciles y divertidos que hemos pasado. Por siempre estar para mí y por compartir parte de su vida conmigo.

«No es la más fuerte de las especies la que sobrevive y tampoco la más inteligente. Sobrevive aquella que más se adapta al cambio».

“El origen de las Especies”

Charles Darwin



# Contenido

Resumen .....	8
Abstract.....	9
<b>1.- Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.- Respuesta en animales a depredadores .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.- Respuesta de plantas a herbivoría .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3.- Vías de señalización involucradas en la respuesta a herbívoros .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4.- Los hongos y sus interacciones en el ecosistema .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5.- Vías de MAPK en hongos.....</b>	<b>6</b>
<b>1.6.- Respuesta a estrés oxidativo .....</b>	<b>7</b>
<b>1.7.- Respuesta a condiciones de Hipoxia.....</b>	<b>8</b>
<b>1.8.- Respuesta a escasas de nutrientes.....</b>	<b>8</b>
<b>1.9.- Respuesta a daño mecánico .....</b>	<b>9</b>
<b>1.10.- Metabolismo secundario en hongos.....</b>	<b>10</b>
<b>1.10.1.- Policétidos .....</b>	<b>10</b>
<b>1.10.2.- Péptidos no ribosomales .....</b>	<b>10</b>
<b>1.10.3.- Terpenos .....</b>	<b>11</b>
<b>1.11.- Metabolismo secundario de hongos en defensa contra insectos micófagos .....</b>	<b>12</b>
<b>1.12.- Hongos del género <i>Trichoderma</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>1.12.1.- Metabolismo secundario de <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>2.- Justificación.....</b>	<b>17</b>
<b>3.- Hipotesis .....</b>	<b>18</b>
<b>4.- Objetivo general .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.- Objetivos particulares .....</b>	<b>18</b>
<b>5.- Materiales y métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>5.1.- Cepas utilizadas.....</b>	<b>19</b>
<b>5.2.- Condiciones de crecimiento y preservación de las cepas utilizadas .....</b>	<b>19</b>
<b>5.3.- Medios de Cultivo .....</b>	<b>19</b>
<b>5.4.- Colecta de larvas .....</b>	<b>20</b>
<b>5.5.- Interacciones <i>Drosophila-Trichoderma</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>5.6.- Análisis de sobrevivencia de Larvas. ....</b>	<b>20</b>
<b>5.7.- Análisis de preferencia de alimento (Food Choice).....</b>	<b>20</b>

5.8.- Análisis de no preferencia o repulsión: (“no choice”)	21
5.9.- Respuesta de <i>T. atroviride</i> a las secreciones de las larvas	21
5.10.- Supervivencia de <i>T. atroviride</i> en el cuerpo de <i>D. melanogaster</i> .	21
5.11.- Extracción de DNA	22
5.12.- Extracción de RNA y RT-PCR	23
5.13.- Determinación de metabolitos secundarios	24
5.14.- Medición	25
5.15.- Medición de compuestos volátiles.	25
6.- Resultados	27
6.1.- La micofagia por larvas de <i>D. melanogaster</i> induce una respuesta morfológica similar a la observada por daño mecánico en <i>T. atroviride</i> .	27
6.2.- El daño mecánico induce cambios en la producción de metabolitos secundarios de <i>T. atroviride</i> .	28
6.3.- Selección de genes para la realización de RT-PCR y RT-PCR en tiempo real	31
6.4.- El daño mecánico y la micofagia, inducen cambios en la expresión de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios	32
6.5.- La mutante $\Delta tmk3$ es más susceptible a la micofagia por larvas que la cepa silvestre	34
6.6.- La mutante $\Delta tmk3$ produce menos metabolitos secundarios que la cepa silvestre	35
6.7.- La mutante $\Delta tmk3$ produce menos compuestos volátiles que la cepa silvestre y la mutante $\Delta tmk1$	37
6.8.- La MAPK Tmk3 es necesaria para la expresión de <i>lae1</i> y del factor de transcripción <i>bZIP 39837</i> , durante daño mecánico y micofagia	40
6.9.- La mutante $\Delta tmk3$ es capaz de matar más larvas que la cepa silvestre y que la mutante $\Delta tmk1$	42
6.10.- Análisis de la elección de alimento (cepas mutantes y silvestres) de larvas de <i>D. melanogaster</i>	43
7.- Discusión	48
8.- Conclusiones	56
12.- Referencias	57

## Índice de Figuras

Figura 1.- Mecanismo de la inducción de Resistencia en plantas..	3
Figura 2.- Modelo de las redes de señalización para defensa de las plantas para responder a insectos masticadores (orugas) e insectos chupadores (Aphids and Spider mites).	4
Figura 3: Respuesta morfológica de <i>T. atroviride</i> al daño mecánico y micofagia	27
Figura 4.- Emergencia de <i>T. atroviride</i> de los estadios de las larvas de <i>D. melanogaster</i> .	28
Figura 5.- Producción de compuestos a diferentes tiempos después de daño mecánico.	30
Figura 6.- Graficas de comparación en la producción de volátiles de <i>T. atroviride</i> durante daño mecánico y micofagia.	31
Figura 7.- RT-PCR en tiempo final de genes de <i>T. atroviride</i> .	33
Figura 8.- PRC en tiempo real de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios a diversos tiempos en las condiciones de daño y de micofagia.	34
Figura 9.- Análisis morfológico de la respuesta a daño mecánico y a micofagia.	35
Figura 10.- Mapa de calor de iones con m/z con un rango de 50 a 250	37
Figura 11.- Comparación en la producción de 6PP entre la cepa silvestre y las mutantes durante daño mecánico y micofagia	38
Figura 12.- Producción de sesquiterpenos totales en la cepa silvestre y en las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ en condiciones control daño mecánico y micofagia.	39
Figura 13.-Producción de compuestos de ocho carbonos con m/z de 333 en la cepa silvestre y en mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ en las condiciones control, daño y micofagia.	40
Figura 14.- Comparación en la expresión de los genes <i>lae1</i> , bZIP 314604 y 39837 entre la cepa silvestre y la mutante $\Delta tmk3$ .	41
Figura 15.- Efecto de la interacción con <i>T. atroviride</i> silvestre y las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ en la supervivencia y ciclo de vida de las larvas de <i>D. melanogaster</i> .	42
Figura 16.- Ensayos de “Food choice” entre la cepa silvestre y las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ .	44
Figura 17.- “Food choice” de las combinaciones de la cepa silvestre y las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ con daño.	45
Figura 18.- Ensayos de “No choice” de las cepas de <i>T. atroviride</i> silvestre y las mutante $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ , así como sus respectivas cuantificaciones.	46
Figura 19.- Ensayos de “No choice” de las cepas de <i>T. atroviride</i> silvestre y las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ con daño así como sus respectivas cuantificaciones.	47

## Resumen

Los hongos son organismos sésiles, que en el ecosistema están expuestos a una gran variedad de antagonistas o por depredadores (organismos micófagos). Estos organismos producen una gran variedad de metabolitos secundarios, que no son necesarios para su desarrollo. Debido a la toxicidad que presenta la mayoría de los compuestos fúngicos contra muchos animales, se ha propuesto que estos compuestos pueden servirle como defensa contra micófagos, de manera análoga con lo observado en la defensa química existente de las plantas contra herbívoros. El presente trabajo está enfocado en *Trichoderma atroviride*, un hongo usado ampliamente como organismo de biocontrol, debido a su actividad micoparasítica que presenta y por la relación benéfica que puede establecer con las plantas, promoviendo su desarrollo e induciendo respuestas de defensa. En este trabajo se describe la respuesta de *T. atroviride* a daño mecánico y a micofagia, desde una perspectiva metabólica, abordada por mediciones de metabolitos secundarios durante el daño mecánico y micofagia y por análisis de expresión de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios. Además establecemos el papel de las vías de MAPKs (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases) en la respuesta metabólica a estos dos tipos de estrés en *T. atroviride*.

Demostramos la importancia de los metabolitos secundarios en la defensa de *T. atroviride* contra micofagia, ya que mediante interacciones hechas de este hongo con larvas de *Drosophila melanogaster*, observamos un aumento en la producción de diversos compuestos después del daño mecánico mientras que en micofagia, hay disminución de algunos compuestos. Así mismo, proponemos que la 6-pentil-alfa-pirona tiene un papel importante en desencadenar una respuesta contra daño mecánico y micofagia. Por medio de ensayos de RT-PCR cuantitativos relacionamos el aumento en la producción de metabolitos secundarios durante daño mecánico con el aumento en la expresión de genes relacionados con la producción de éstos, y la reducción de la expresión de estos genes con la disminución en la producción de los compuestos. Así mismo encontramos que las MAPKs TMK1 y TMK3 juegan un papel importante en regulación de la producción de metabolitos secundarios en *T. atroviride*, y participan en la respuesta metabólica a daño mecánico y a micofagia.



## Abstract

Fungi are sessile organisms that in the ecosystem are exposed to a variety of antagonists and predators (fungivorous organisms). It is known that fungi produce a wide variety of secondary metabolites, which are not necessary for their development. Because of the toxicity that most fungal metabolites present against many animals, it has been proposed that these compounds can serve as a defense against fungivorous insects, in analogy to what has been observed in the existing chemical plant defense against herbivores. This work focuses on *Trichoderma atroviride*, a fungus widely used as biocontrol agent because of its mycoparasitic activity, and the beneficial relationship it establishes with plants, promoting their development and inducing defense responses. In this work, we described the *T. atroviride* response to mechanical damage and fungivory from a metabolic perspective, approached by measurements of secondary metabolites during mechanical damage and fungivory and the expression analysis of related genes with the production of secondary metabolites. Moreover, we establish the role of MAPK pathways (Mitogen-activated Protein Kinases) in the metabolic response to these two types of stress in *T. atroviride*. Through interactions made of *T. atroviride* with *Drosophila melanogaster* larvae, we emphasize the importance of secondary metabolites in defending against mechanical damage and fungivory in *T. atroviride*, since, an increase of various compounds is observed in the wild strain after mechanical damage, while in fungivory the intensity of some compounds decrease. We propose that the 6-penthyl- $\alpha$ -pyrone plays an important role in triggering the response to mechanical damage and fungivory. Using quantitative RT-PCR assays we established a correlation of the increase in secondary metabolite production during mechanical damage with increases in the expression of genes related to their production, while reducing the expression of these genes correlates with decreases in the production of these metabolites during fungivory. In addition, we demonstrate that the MAPKs TMK1 and TMK3 play an important role in regulating the production of secondary metabolites in *T. atroviride*, and participate in the metabolic response to mechanical damage and fungivory.

## 1.- Introducción

Todos los organismos en la naturaleza están constantemente expuestos a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico que pueden alterar diferentes procesos fisiológicos en su biología. Algunos de los factores ambientales que se sabe generan estrés en todos los organismos son: altas temperaturas, sequía, radiación ultravioleta, escases de nutrientes, entre muchos otros. La capacidad de responder a estrés de los organismos ha sido mantenida por selección natural que se sabe incrementa la habilidad de los organismos para enfrentar situaciones que requieren acción o defensa (Potters et al, 2007). La mayoría de los organismos están expuestos a competidores, patógenos y en algunos casos depredadores y al igual que para las respuestas a estrés abiótico, se han desarrollado estrategias especializadas para defenderse de estas factores adversos.

El presente estudio está enfocado en la respuesta de los organismos a depredadores desde una perspectiva metabólica y en específico en la respuesta de los hongos, ya que esta línea es poco abordada y la evidencia existente es escasa.

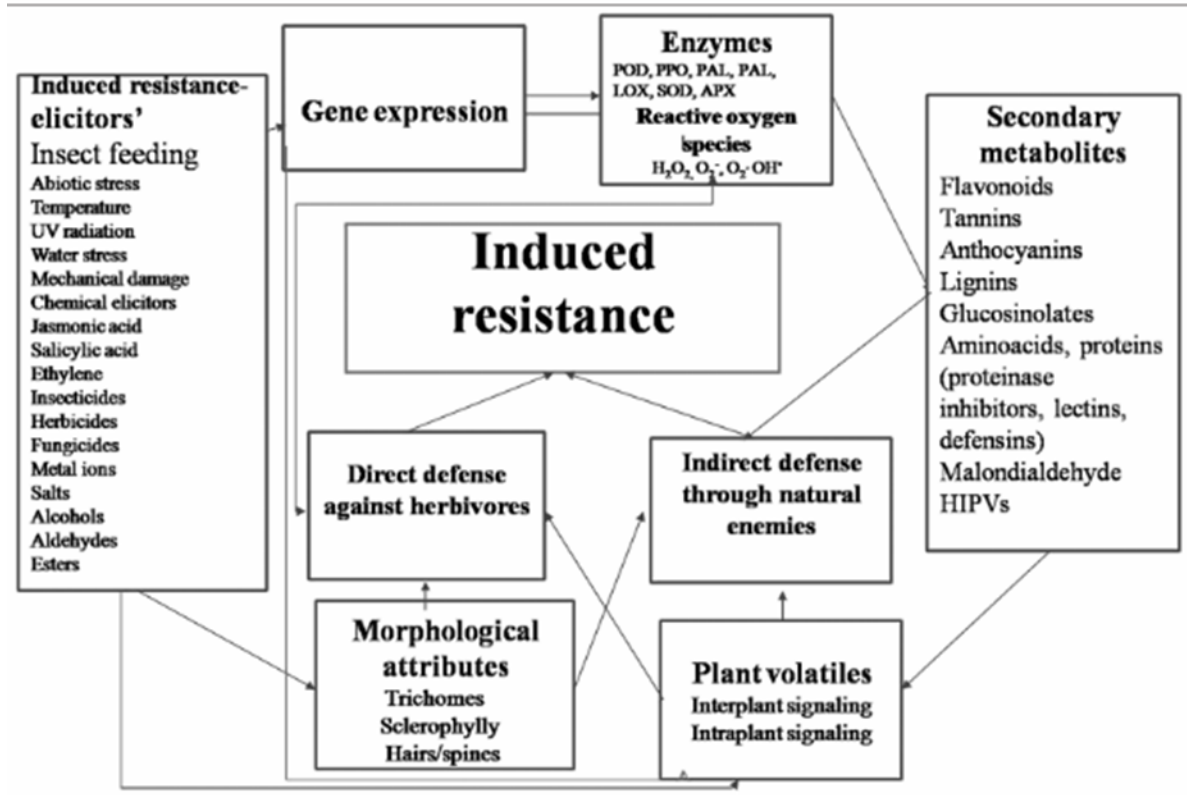
### 1.1.- Respuesta en animales a depredadores

Los animales han desarrollado diversas estrategias para defenderse de sus depredadores como pueden ser la capacidad de camuflarse en ambientes hostiles como las mariposas monarca, los camaleones, algunas serpientes y aves o incluso han desarrollado estructuras morfológicas (defensa mecánica) que pueden advertir de peligro a sus depredadores como los *Phrynosomas*, el caparazón de las tortugas, las púas de los puercoespín, por mencionar algunos. Una de las armas más importantes que tienen algunas especies de animales para defenderse de sus depredadores es su defensa química. En los vertebrados inferiores están representados con esta propiedad (defensa química) los grupos de los peces, anfibios y reptiles (Lippert et al, 2004). En las aves, solamente se conocen a *Ifrita kowaldi* y algunas especies del género *Pitohui*, y en los mamíferos únicamente tiene esta facultad el *Ornithorhynchus anatinus* perteneciente al grupo de los monotremas y los zorrillos de la familia de los mefítidos. En el grupo de los reptiles destacan en este aspecto los ofidios (serpientes), en los que se da una cierta variedad de sustancias venenosas de toxicidad muy elevada entre las especies de clima desértico y tropical, como la *Naja*, *Crotalus*, etc. Entre los lagartos existen varios casos: el género *Heloderma*, con sus dos especies, *Heloderma horridum* y *Heloderma suspectum*; y recientes investigaciones han demostrado que al menos dos

especies del género *Varanus*, el varano arborícola (*Varanus varius*) y el dragón de Komodo (*Varanus komodoensis*) poseen glándulas venenosas a lo largo de su línea mandibular que, al ocurrir una mordedura, inoculan una serie de toxinas de efecto anticoagulante (así como una gran cantidad de bacterias, haciendo la sepsis una consecuencia común de dicha mordedura) (Mackessy y Heyborne, 2009) . Mientras que en el grupo de invertebrados, el grupo más grande de animales, hay una gran variedad de familias que producen toxinas y/o venenos que usan como defensa. Entre estos grupos tenemos a los: *Miriapodos* y *Scolopendra* (milpiés y ciempiés respectivamente), algunos integrantes de la familia *Hemiptera* (chinchas) y la mayoría de los arácnidos siendo estos últimos de los más venenosos (Pucca et al., 2016). Con todos los ejemplos aquí mencionados resaltamos la importancia que tiene la defensa química y como se ha conservado en muchas de las familias de animales.

## **1.2.- Respuesta de plantas a herbivoría**

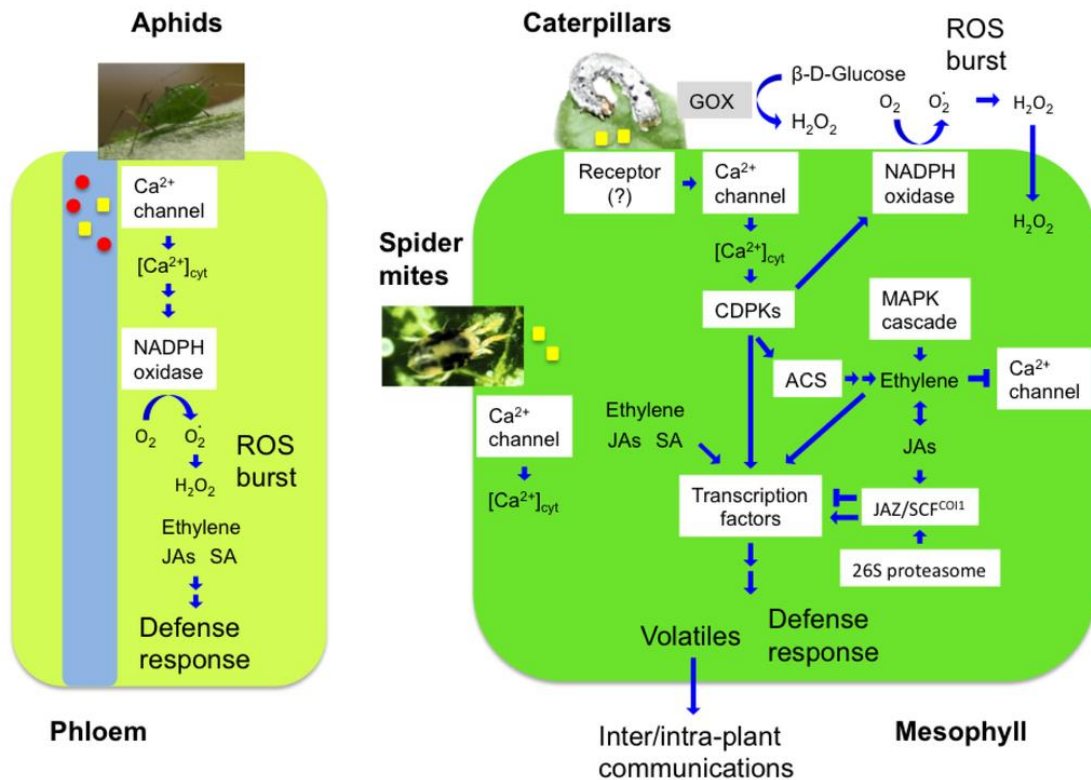
Plantas e insectos han convivido por más de 350 millones de años, y a lo largo de este tiempo han ocurrido eventos de co-evolución en los cuales ambos han desarrollado estrategias para superar las barreras entre unos y otros. Las plantas son organismos sésiles que no pueden huir de sus depredadores, como los animales, así que han tenido que desarrollar armas especializadas para defenderse. Esta carrera armamentista entre plantas y animales ha resultado en el desarrollo de un elegante sistema de defensa en plantas, teniendo la habilidad de reconocer moléculas extrañas o señales de células dañadas, como los animales y activar el sistema de defensa contra herbívoros (War et al, 2012). Las plantas responden al ataque de herbívoros por medio de un sistema especializado de defensa que incluye barreras físicas, defensa química y atracción de enemigos naturales de sus plagas (Heil, 2009). Los dos mecanismos de defensa conocidos en plantas se definen como defensa directa y defensa indirecta que pueden ser constitutivos o inducidos por el daño causado por los herbívoros a las células (Figura 1) (War et al, 2012). Los mecanismos de defensa inducidos han sido de los más estudiados y constituyen uno de los componentes principales para proteger a las plantas de plagas y por eso ha sido de gran importancia el estudio de su regulación



**Figura 1.-** Mecanismo de la inducción de resistencia en plantas. POD, peroxidasa, PPO Polifenol oxidasa, PAL Fenilalanina amonio liasa, TA, Tirosina, AAL, Alanina Amonio Liasa LOX, lipoxigenasa, SOD, superóxido dismutasa, APX, ascorbato peroxidasa, HIPVs, volátiles inducidos por herbívoros.

Dentro de los mecanismos de defensa contra herbívoros está la defensa química que es la producción de metabolitos secundarios la cual puede ser constitutiva o inducida durante el ataque de insectos o microorganismos. Esta respuesta comienza con el reconocimiento, por parte de la planta, de las secreciones bucales de los insectos y de los daños celulares que ellos producen, estas secreciones se conocen como elicitores. Uno de los elicitores aislados de secreciones bucales de la oruga de la remolacha (*Spodoptera exigua*) es el volicitin, este compuesto es reconocido por las plantas y activa la formación de compuestos que atraen avispas parasitas de los herbívoros. Otra clase de elicitor conocido es la caeliferina, producido por saltamontes (*Caelifera*). Una vez que se reconocen los elicitores se lleva a cabo la inducción de genes involucrados en la síntesis de terpenos, alcaloides, así como genes involucrados en reparación de daño, incluyendo sintasas de calosa y peroxidasa. La herbivoría induce además la acumulación de proteínas o componentes con propiedades anti nutritivas, es decir que interfieren con las enzimas del intestino del insecto que necesita para absorber los nutrientes obtenidos de los tejidos vegetales depredados (Kant y Williams, 2011).

La mayoría de las respuestas de defensa en plantas son mediadas por fitohormonas como el jasmonato, etileno y salicilato. Se sabe que el jasmonato y el etileno se acumulan en respuesta a herida o a insectos chupadores, mientras que la producción de una combinación de jasmonatos y salicilatos es inducida en respuesta a insectos perforadores. El jasmonato (JA) actúa combatiendo a los herbívoros en su forma más activa, como un aminoácido conjugado (JA-Ile), que activa factores de transcripción e induce la expresión de genes de defensa (Arimura et al., 2011) (Figura 2).



**Figura 2.-** Modelo de las redes de señalización para defensa de las plantas para responder a insectos masticadores (orugas) e insectos chupadores (pulgones y ácaros). En general los insectos masticadores inducen respuestas de defensa dependientes de JA y los insectos chupadores inducen respuestas de defensa dependientes de SA. Abreviaciones: ACS, sintasa de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC); CDPKs, Proteína Cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ ; GOX, Glucosa oxidasa; JAs, jasmonatos; MAPK, Mitogen activated protein cinasa; ROS, especies reactivas de oxígeno; SA, Ácido salicílico (modificado de Arimura et al., 2011.)

### **1.3.- Vías de señalización involucradas en la respuesta a herbívoros**

Procesos de señalización al interior de la célula requieren que vías de transducción de señales reconozcan la señal (elicitador) y transfieran la señal a la maquinaria nuclear a través de redes de interacción río abajo de los receptores. Vías de señalización de MAPK (del inglés “mitogen-activated protein kinases”) y  $\text{Ca}^{2+}$  juegan papeles muy importantes en mediar la respuesta a herbívoros. Dentro de las vías de MAPKs descritas relacionadas a herida o a herbívora tenemos a las SIPK (proteínas cinasas inducidas por ácido salicílico (SA)) y a las WIPK (proteína cinasas inducidas por herida). Se sabe que las WIPK actúan inmediatamente después de la herida, ya que se acumulan transcritos de estas proteínas un minuto después del daño mecánico, llevando a la inducción de la producción de transcritos de genes de la vía del JA, mientras que la activación de SIPK después de la herida es asociada con un incremento de fosforilación de tirosina pero al contrario de lo que pasa con las WIPK, en éstas no hay un incremento de RNAm o niveles de proteínas de SIPK (Figura 2) (Seo et al, 2007). Adicionalmente las plantas poseen una gran diversidad de clases de proteínas sensoriales únicas para la vía de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ , incluyendo calmodulinas (CaMs), proteínas tipo calmodulinas, proteínas tipo calcineurina tipo B, y proteína cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPKs); estas reconocen al  $\text{Ca}^{2+}$  como una molécula señal para activar principalmente genes de defensa como las defensinas (PDF1.2) (Sanders et al., 2002).

En resumen los sistemas de defensa inducidos por herbívoros reflejan una intercomunicación integrada entre moléculas señal, incluyendo iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , especies reactivas de oxígeno (ROS), proteína cinasas, JA, SA y etileno, entre otros (Maffei et al., 2007; Figura 2).

### **1.4.- Los hongos y sus interacciones en el ecosistema**

Los hongos son un grupo de organismo que no puede fijar su energía directamente, pero usan la almacenada en la biomasa de plantas y animales para crear su propia masa. Los hongos son importantes para manejar o controlar el ciclo de minerales y energía en el ecosistema. Así mismo, estos organismos se encuentran en la rizósfera interactuando con otros, como bacterias, otros hongos, parásitos, y plantas. La forma en que los hongos interactúan, principalmente con plantas, es como patógenos, simbioses, o parásitos. En algunos ejemplos de simbiosis llegan a proveer de defensa contra herbivoría y mejorar los niveles de nutrientes en las plantas. Una de las características por la cual hace el grupo de los hongos es tan exitoso,

es su capacidad de producir enzimas degradadoras de la biomasa presente en el ecosistema como celulasas, xilanasas, glucanasas, que le facilitan el reciclaje de nutrientes en el ecosistema y para su consumo propio.

Como un componente del ecosistema y como organismos sésiles, los hongos están expuestos a diversos tipos de estrés y pueden ser consumidos por animales como fuente de alimento, debido al alto contenido de nutrientes como proteínas y vitaminas que se obtienen de sus estructuras. Para el caso de los cuerpos fructíferos de basidiomicetes y algunos ascomicetes, los organismos que más los consumen son insectos y sus larvas e incluso mamíferos pequeños (por ejemplo roedores), mientras que las hifas y esporas que se encuentran en el suelo son fuente de alimento para ácaros micófagos, colémbolos, nemátodos y larvas de insectos (John, 2003).

Dentro de las respuestas a estrés que han sido más estudiadas en hongos están la respuesta a estrés por calor, pH, radiaciones, estrés oxidativo, escases de nutrientes y recientemente a daño mecánico.

### **1.5.- Vías de MAPK en hongos**

Las MAPK (del inglés Mitogen-activated protein kinases), consisten en MAP cinasas (MAPK), MAPK cinasas (MAPKK) y MAPKK cinasas (MAPKKK); siendo vías de transducción de señales conservadas en eucariotas, especializadas en regular las respuestas de los organismos a señales ambientales, división celular y diferenciación (Borkovich y Ebbole, 2010). En hongos los primeros estudios sobre MAPK fueron realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, describiéndose hasta el momento cinco cascadas (Fus3, Kssl, Hogl, Mpk1 y Smk1) involucradas en el apareamiento, adaptación a condiciones hiperosmóticas, integridad de pared celular, crecimiento invasivo o pseudohifal, crecimiento vegetativo y formación de la pared de ascosporas. En *Candida albicans* han sido identificadas y caracterizadas cuatro MAPK (Mpk1, Hogl, Cek2 y Cek1), Mpk1 y Hogl, están involucradas en la respuesta a estrés oxidativo disparada por fagocitos que combaten a los microorganismos patogénicos (Alonso-Mongue et al., 2009). La mayoría de los hongos filamentosos poseen tres vías de MAPK (Fus3/Kssl, Slt2 y Hog1), involucradas en la respuesta a estrés osmótico, integridad de pared celular y crecimiento vegetativo. Para *Aspergillus* spp. se han descrito cuatro vías de MAPK (SakA/HogA, MpkA, MpkB y MpkC); en *A. fumigatus*, *A. nidulans* y *A. oryzae*, que participan en desarrollo,

tolerancia a estrés, crecimiento vegetativo, integridad de la pared celular y metabolismo secundario (May et al, 2005). En general las vías de MAPK conservan una estructura y organización funcional similar; sin embargo, las diferencias existen en la especialización de las cascadas.

Los eventos bioquímicos que llevan a la activación de las MAPK han sido bien estudiados. Cuando se activa la MAPKKK fosforila en un residuo de serina y treonina, en un dominio amino terminal conservado de la MAPKK. La activa MAPKK fosforilada, después fosforila las MAPK en una treonina y tirosina conservadas. Los aminoácidos están separados por un aminoácido y son localizados en el “loop” de activación en el dominio cinasa conservado. Una vez que estos dos aminoácidos son fosforilados, la MAPK es totalmente activa. En muchas vías de MAPK los blancos río abajo son factores de transcripción que llevan a cambios en la expresión de genes, los activadores río arriba de las MAPK son sistemas de transducción de señales que generalmente consisten de un sensor que señala a través de otras proteínas cinasa regularmente un miembro de la familia de cinasas activadas p21 u otras proteínas cinasas (May et al, 2005).

### **1.6.- Respuesta a estrés oxidativo**

Los hongos han desarrollado estrategias especializadas para responder a los diferentes tipos de estrés en la naturaleza. Los tipos de respuesta a estrés que han sido ampliamente investigados en hongos son el estrés osmótico, estrés por limitación/ausencia de nutrientes, choque térmico, daño a DNA y estrés oxidativo. El estrés oxidativo se refiere a la exposición de los organismos, incluyendo a los hongos a especies reactivas de oxígeno (ROS), que se presentan como especies parcialmente reducidas de oxígeno. Dentro de las respuesta a estrés oxidativo, se han identificado genes especializados en responder a este tipo de estrés, como el factor de transcripción de la familia bZIP *Yap1*, otros factores de transcripción estudiados en la respuesta a estrés en hongos son *Skn7* o *Cta4p* en *Candida albicans*, un regulador global de respuesta a estrés oxidativo, presente en todas las especies de hongos (Rodrigues-Pousada et al., 2010, Kroll, et al., 2014). El factor de transcripción relacionado a estrés oxidativo *AtfB* (bZIP), juega un papel clave en coordinar la expresión de genes antioxidantes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios en *A. nidulans* y *Botrytis cinerea* (Hong, et al., 2013;



Temme et al, 2012). Datos disponibles sugieren que la mayoría de los factores de transcripción aquí mencionados están asociados a las proteínas cinasas activadas por estrés (MAPK/SAPK).

Estas vías en conjunto controlan la expresión de genes incluyendo genes de metabolismo antioxidante y metabolismo secundario, que controlan procesos metabólicos relacionados con la respuesta a estrés celular.

### **1.7.- Respuesta a condiciones de Hipoxia**

El agotamiento de oxígeno (hipoxia) es otro factor de estrés al que tienen que hacer frente los hongos. En este aspecto se ha visto que en condiciones de hipoxia levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* la síntesis de ergosterol (componente muy importante que mantienen la fluidez de la membrana plasmática), baja ya que está es dependiente del oxígeno molecular (entrando a sí en fase fermentativa), además se sabe que afecta la producción de metabolitos importantes para la patogenicidad de hongos como *Aspergillus fumigatus* contra humanos (Kroll et al., 2014).

### **1.8.- Respuesta a escasas de nutrientes**

La baja disponibilidad de nitrógeno y fuentes de carbono es otra situación común a la que se enfrentan los hongos, en hongos se han descrito los factores de transcripción de la familia GATA que median un control general definido como represión metabólica de nitrógeno. Bajo estas condiciones de baja disponibilidad de estos nutrientes se dispara la expresión de genes relacionada con la utilización de fuentes alternas de nitrógeno, como el amonio, aunque es sabido que el amonio causa también represión catabólica (esta regulación es compleja, ya que la falta de fuentes primarias activa expresión de genes, y la presencia de este tipo de fuentes, como el amonio reprime algunos genes). En levaduras, una vía de señalización que se ha descrito regula la expresión de genes en bajas o altas concentraciones de nitrógeno es la vía de TOR.

La limitación de fuentes de carbono también altera la fisiología de los hongos. El uso de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno está regulado por las proteínas *CreA* (para carbono) y *AreA* (para nitrógeno) en hongos filamentosos (Ruijter y Visser, 1997). En muchos casos también se ha visto que la limitación de carbono afecta la producción de metabolitos secundarios en los hongos (Suto y Tomita, 2001). Al igual que en la respuesta a estrés osmótico, las vías de MAPK son elementos esenciales para que se puedan llevar a cabo las respuestas

a la falta de nutrientes. Hariwara y colaboradores (2014) proponen un modelo en el cual las MAPK SakA y MpkC, juegan un papel cooperativo en conferir resistencia a estrés en conidios vía el factor de transcripción *AtfA*, donde *SakA* es la MAPK predominante activada por estrés en el crecimiento de hifas en *A. fumigatus* en respuesta a la presencia de nutrientes.

### **1.9.- Respuesta a daño mecánico**

La respuesta a daño mecánico ha sido muy poco estudiada en hongos, existen escasos reportes acerca de este fenómeno y los reportados han sido inicialmente en el hongo basidiomiceto *Schizophyllum commune* por Leonard y Dick (1973). Quienes durante sus investigaciones observaron que al hacerle daño al micelio de este hongo se inducía la producción de cuerpos fructíferos. Otros reportes en *Sclerotium rolfsii*, indican que al hacerle daño a su micelio se induce la producción de esclerocios. En hongos basidiomicetes se ha visto que al dañar los cuerpos fructíferos de hongos no tóxicos o venenosos se induce la producción de compuestos tóxicos para muchos animales e incluso se propone que al igual que las plantas, estos compuestos inducidos podrían servir como defensa contra posibles depredadores (Spiteller, P., 2008); sin embargo, este tema es aún menos investigado que el daño mecánico. Recientemente, Hernández-Oñate analizó la respuesta a daño mecánico en el hongo ascomiceto *Trichoderma atroviride* y observó que después de 48 horas de hacerle daño al micelio se forman conidios justo en el área dañada, y lo que es muy interesante al observar que pasaba con las hifas heridas observó que eran capaces de regenerarse y dar lugar no sólo a una hifa nueva si no que eran las responsables de la formación de conidios observadas tiempo después. Además establece que esta respuesta de los hongos presenta muchas analogías con las respuestas observadas en animales y plantas. Así mismo, Medina-Castellanos (2014) con el interés por descubrir vías de señalización involucradas en la respuesta a daño mecánico analizó mutantes de MAPKs. Dentro de sus descubrimientos se encuentra que estas mutantes tienen una capacidad de conidiar en respuesta a herida muy reducida, lo que da indicios de que estas MAPK son esenciales para la respuesta morfológica al daño mecánico. Sin embargo, no se sabe si al igual que en las plantas, los metabolitos secundarios tienen un papel en la respuesta a daño mecánico o si se induce la producción de compuestos diferentes como en los hongos basidiomicetos analizados por Spiteller, (2008).

## **1.10.- Metabolismo secundario en hongos**

Los hongos están dentro de los principales organismos productores de metabolitos secundarios que tienen diversas actividades biológicas de interés humano ya sea médico o industrial. Los metabolitos secundarios producidos por los hongos aunque no son indispensables para la supervivencia de estos organismos les proveen ventajas en ambientes hostiles. En especies de *Aspergillus* se ha visto que los metabolitos secundarios participan en la conidiación o la formación de cuerpos fructíferos sexuales y esclerocios (Calvo et al, 2006., Fisher y Kues, 2006., Calvo y Cary, 2015).

Los metabolitos secundarios se clasifican de diferentes maneras (por su actividad, por su importancia médica o industrial o por el tipo de enzima que los producen), aquí describiremos brevemente la clasificación de acuerdo a las enzimas que los producen (policétido sintasas (PKS), péptido sintasas no ribosomales (NRPS), terpeno sintasas (TS) y sintasas de ácidos grasos).

### **1.10.1.- Policétidos**

Los policétidos son los metabolitos secundarios más abundantes producidos por hongos, sintetizados por policétido sintasas tipo I (PKSs), las cuales son proteínas multidominio relacionadas a las sintasas de ácidos grasos y contienen dominios estructurales similares. Las diferencias entre policétidos y ácidos grasos es la total reducción del carbono- $\beta$  en los ácidos grasos, que es un evento opcional en la síntesis de policétidos. Para que se lleve a cabo la síntesis de policétidos, dominios de cetoacil sintasas (KS), acetil transferasas (AT), acil acarreadores (ACP), son esenciales, mientras que las cetoreductasas (KR), deshidratasas (DH) y enoil reductasas que son requeridas para la reducción de cetonas en ácidos grasos, no están presentes en todas las enzimas PKS de hongos (Keller et al, 2005). La diversidad de estructuras de policétidos fúngicos resulta del número de reacciones de iteración, el número de reacciones de reducción, que unidad de extensor se utiliza y, en el caso de policétidos aromáticos, ciclaciones de la cadena de policétido naciente.

### **1.10.2.- Péptidos no ribosomales**

Los péptidos no ribosomales son derivados de aminoácidos proteinogénicos y de aminoácidos no proteinogénicos, por enzimas multimodulares con mutidominios llamadas Péptido Sintasas no Ribosomales (NRPS, por sus siglas en inglés). Cada módulo en una NRPS

contiene muchos dominios que permiten el reconocimiento, activación y la unión covalente de un aminoácido modulo-específico como el tioester al cofactor 4'-fosfopantetein, el cual está unido a cada módulo a través de una serina conservada. Subsecuentemente, los enlaces peptídicos son formados entre los aminoácidos unidos. El péptido resultante es después liberado por un dominio tipo tioesterasa que está usualmente localizada en el C-terminal al final del módulo. Los dominios que llevan a cabo estas actividades son llamados adenilación (A), pantotenilación/ peptidil acarreador (P), condensación/formación del enlace peptídico (C) y tioesterasa (TE). El primer péptido no ribosomal fúngico identificado,  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipyl)-L-cisteinyl-D-valine synthase (ACVS), cataliza el primer paso en la biosíntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilina y cefalosporina). La diversidad de péptidos no ribosomales recae en la longitud de péptidos producidos, del péptido ciclizado y las variaciones en las funciones de los dominios (Keller et al, 2005).

### 1.10.3.- Terpenos

Los terpenos más conocidos con los metabolitos aromatizantes en plantas como alcanfor y trementina, pero los hongos también sintetizan muchos terpenos importantes, incluyendo aristoquenos, carotenoides, giberilinas, indol diterpenos y trichotecenos. Todos los terpenos están compuestos de muchas unidades de isopreno, pueden ser lineales o cíclicos, saturados o insaturados y pueden ser modificados de diversas maneras. Comúnmente las clases de terpenos incluyen los monoterpenos, que son generados del geranil pirofosfato; los sesquiterpenos son generados del farnesil pirofosfato; y los diterpenos y carotenoides que son generados del geranil-geranil pirofosfato.

Una gran variedad de terpeno ciclasas de hongos han sido caracterizadas, incluyendo una terpeno ciclasa bifuncional de *Gibberella fujikoro* (Tudzynski et al, 2001), un trichodieno sintasa de *Fusarium sporotrichioides* (Rynkiewicz et al, 2001) y aristoloqueno ciclasa de *Aspergillus terreus* y *Penicillium roquefortii* (Carruthers et al, 2000). La síntesis de carotenoides ha sido estudiada en *Neurospora crassa*, encontrando sólo una geranil-geranil difosfato sintasa en su genoma (Schmidhauser et al, 1990).

Los genes que codifican para las enzimas responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentran organizadas en forma de clusters en los cromosomas fúngicos, de manera semejante a los operones en bacterias. Análisis de los genomas de muchos hongos

secuenciados recientemente han permitido evidenciar que en este grupo en particular de eucariotas hay un enriquecimiento en genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios. Los clusters de genes de metabolismo secundario (MS) son transcripcionalmente regulados por factores de transcripción tipo bZIP y MAPKs y por proteínas unidas a cromatina como *LaeA* (Bok y Keller, 2004; Bayram et al, 2008). Se ha demostrado que *LaeA* controla un gran porcentaje de clusters de metabolismo secundario así como varios aspectos de la biología de *A. nidulans* (Bayram et al, 2008), además que interactúa con otras dos proteínas, *VeA* y *VelB*, que en conjunto coordinan el desarrollo y el metabolismo secundario en *A. nidulans* (Bayram et al, 2015). Recientemente se han encontrado más metiltransferasas que interactúan con el complejo Velvet, en específico con *VeA*, y se ha visto que también regulan metabolismo secundario (Palmer et al., 2013; Bayram et al., 2015).

Las vías de transducción de señales de MAPK también están relacionadas con el desarrollo y la producción de metabolitos secundarios, en *A. nidulans* se ha caracterizado el módulo de MAPK que responde a feromonas, MAPK3 *Ste11* (*SteC*), MAPK2 *Ste7* y MAPK *Fus3* (*MpkB*)-*AnFus3* (Bayram et al, 2012). *AnFus3* no sólo es requerida para el desarrollo sexual sino, también controla el metabolismo secundario que es una característica importante de los hongos filamentosos, pero ausente en levaduras. Bayram y colaboradores (2012) proponen que *AnFus3* es capaz de viajar a través de la membrana y cruzar del citoplasma al núcleo, embebido en el complejo *AnSte7* MP2K, *AnSte11* MAP3K y la proteína adaptador *AnSete50*. En el núcleo *AnFus3* interactúa con el factor de transcripción *AnSte12* para iniciar el desarrollo sexual, Adicionalmente *AnFus3* interactúa con *VeA* o con blancos no identificados que promueven la formación del complejo *VeA-VelB* que es requerido para coordinar el desarrollo y el metabolismo secundario (Bayram et al, 2012).

### **1.11.- Metabolismo secundario de hongos en defensa contra insectos micófagos**

El metabolismo de los hongos es una fuente importante de compuestos orgánicos, que no son requeridos para el desarrollo normal de los hongos. Sin embargo, proveen ventajas frente a condiciones adversas (Tsitsingianis and Keller, 2007; Roze et al., 2011; Brakhage, 2013). Debido a que muchos de los compuestos producidos por los hongos son tóxicos para muchos organismos, se ha propuesto que éstos pueden servir como una defensa química contra depredadores, como en las plantas. Evidencia acerca de la supuesta defensa de los

hongos contra organismos micófagos se había centrado hasta los noventa solo en medir la mortalidad de los insectos basado en mezclas artificiales de compuestos fúngicos (Wright et al, 1980; Gloer, 1995; Rohlfs y Obmann, 2009). Sin embargo, estos primeros estudios proporcionaban evidencia pobre de lo que se propone. Lo que se sugirió entonces fue analizar directamente si bajo condiciones de micofagia los compuestos aumentaban la adecuación en hongos, lo que realmente se puede definir como una defensa química (Rohlfs, 2015). En una serie de estudios recientes, el uso de hongos genéticamente modificados en la expresión de genes candidatos de defensa y relacionados con la producción de metabolitos secundarios y la resistencia contra micófagos, han corroborado la relación entre los mecanismos de regulación de metabolitos secundarios y la resistencia contra insectos micófagos. Sin embargo, hasta el momento, modificar o establecer vías específicas de defensa no ha sido posible.

La mayoría de los estudios hechos entre hongos modificados se han llevado a cabo con especies de *Aspergillus*, en específico con mutantes para el gen *LaeA* interactuando con artrópodos comunes del suelo (*Folsomia candida*) (Rohlfs et al., 2007; Janssens et al, 2010; Stadaden et al, 2011; Doll et al, 2013), o con larvas micófagas facultativas de *Drosophila melanogaster* (Trienens et al., 2010; Caballero-Ortiz et al., 2013; Trienens et al., 2012). Como se ha descrito anteriormente la proteína *LaeA* es esencial para el desarrollo y para la producción de metabolitos secundarios, incluyendo micotoxinas (Bok y Keller, 2004). Mutantes con deficiencias (*A. nidulans*  $\Delta laeA$ ) químicas son más susceptibles a depredación que la cepa silvestre y se ha visto que decrece la mortalidad y al contrario beneficia el desarrollo de los micófagos Este papel de *LaeA* parece ser especie-específico, ya que mutantes  $\Delta laeA$  de *A. nidulans* pierden la capacidad de matar larvas de *D. melanogaster*, mientras que mutantes  $\Delta laeA$  de *A. flavus* y *A. fumigatus* conservan su capacidad de matar a los insectos (Trienens et al., 2010). La habilidad para matar larvas de mosca también ha sido evaluada en mutantes *VeA* de *A. nidulans* e igualmente se observa disminución en la capacidad insecticida (Trienens y Rohlfs, 2012). Basados en sus observaciones, estos autores proponen que la formación del complejo Velvet (VelB-VeA-LaeA) es indispensable para la resistencia de *A. nidulans* contra insectos micófagos (Trienens y Rohlfs, 2012). Al igual que los genes analizados en esta respuesta, se han analizado cepas sobre expresantes para factores de transcripción involucrados en la producción de metabolitos secundarios, como *rsmA*, un factor de transcripción que al sobre expresarlo sobre un fondo mutante para *laeA*, es capaz de recuperar la producción de

Sterigmatocistina, y al hacer interacciones con colémbolos (*F. candida*), estos artrópodos prefieren comerse a la cepa silvestre que a la sobre expresante (Yin et al, 2012). Sin embargo, el estudio de otras vías continua inexplorado.

Caballero-Ortiz y colaboradores (2013) analizaron la expresión de genes de *A. nidulas* durante interacciones con larvas de *D. melanogaster*, observando el encendido de muchos genes, incluyendo algunos relacionados con señales de transducción, señalización por oxilipinas y de biosíntesis de metabolitos secundarios. Otros grupos de trabajo han utilizado como modelo el basidiomiceto *Coprinopsis cinerea*, durante interacciones con el nemátodo micófago *Aphallenchus avenae* con micelio vegetativo de *C. cinerea*, demostrando la inducción en la expresión de lectinas de cuerpos fructíferos CGL1 y CGL2 (Bleuler-Martínes, et al, 2011). Sus descubrimientos han mostrado que las lectinas pueden estar involucradas en el reconocimiento de organismos depredadores, para desencadenar una respuesta que parecen ser específicas a glicanos de sus antagonistas. Las investigaciones recientes en el hongo *C. cinerea* se han enfocado en hacer transcriptomas de la respuesta del micelio vegetativo a diferentes tipos de competidores, como bacterias (*E. coli*), el nemátodo micófago (*Aphalenchus avenae*) y daño mecánico, demostrando que en respuesta a *A. avenae*, *C. cinerea* induce específicamente la transcripción de genes que no se inducen para daño mecánico o para la respuesta a bacterias; en realidad aunque no le dan la importancia que debe, la inducción de genes para cada una de las condiciones es bastante específica (Plaza et al, 2016) y sólo se centran en lectinas antes reportadas por el mismo grupo de trabajo y por Bleuler y colaboradores (2011) y su actividad nematóxica contra *C. elegans* y no hacen mención de la respuesta metabólica.

A pesar de que los estudios de la respuesta han sido trabajados por casi una década, la información generada deja más preguntas que respuestas en cuanto al, reconocimiento, regulación, activación y cómo se lleva a cabo la respuesta a organismos micófagos en hongos, es por eso que es de gran importancia seguir realizando estudios es otras especies de hongos.

## **1.12.- Hongos del género *Trichoderma***

Los miembros del género *Trichoderma* son organismos cosmopolitas, comunes del suelo que han cobrado gran importancia en las aplicaciones humanas, son ampliamente usados como agentes de biocontrol contra organismos fitopatógenos, promotores de crecimiento de plantas, algunos son usados para la producción de biocombustibles en la industria, producción de enzimas y también por la gran variedad de metabolitos secundarios que produce y que son importante para diferentes aplicaciones industriales o médicas (Mukherjee et al., 2014).

### **1.12.1.- Metabolismo secundario de *Trichoderma***

Como ya se mencionó, el género *Trichoderma* (teleomorfo de, *Hypocrea*), incluye especies usadas ampliamente como agentes de control biológico debido a su capacidad de antagonizar a un amplio rango de organismos patógenos de plantas (Harman et al, 2004). Algunas especies tienen la capacidad de inhibir o retardar las enfermedades en plantas a través de su potencial como competidor, antagonista y micoparásito. La habilidad inhibitoria o competitiva de *Trichoderma* se basa en su capacidad de producir una combinación de enzimas como pueden ser las degradadoras de pared celular, y metabolitos secundarios. *Trichoderma* tiene una actividad antimicrobiana contra un importante número de microorganismos (bacterias, levaduras, y otros hongos filamentosos) en la cual participa el gran repertorio de metabolitos secundarios que produce (peptaiboles, gliotoxinas, glioviridinas, pyronas, terpenos). Considerando las características de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* se dividen en: 1) compuestos de bajo peso molecular y compuestos volátiles, incluyendo aquellos que le dan aroma característico a los hongos, como policétidos, pironas, butenólidos, terpenos volátiles y; 2) compuestos de alto peso molecular, compuestos polares, peptaiboles, gliotoxinas, compuestos gliovirínicos, los cuales se ha visto que aumentan en producción durante interacciones de *Trichoderma* contra sus antagonistas.

Más de 120 estructuras de metabolitos secundarios producidos por especies de *Trichoderma* han sido determinadas por métodos analíticos. Sin embargo, pocos se han dado a la tarea de tratar de identificar todas las estructuras y todos los compuestos producidos, ya que se especula que el número de compuestos que producen es de más de 1000, dependiendo de la cepa, las condiciones ambientales, y la sensibilidad del método de detección. Recientemente, en estudios analíticos del metabolismo secundario se han incluido técnicas a nivel genético y genómico. Como ha sido reportado para otros hongos, las proteínas G y MAPK



afectan el metabolismo secundario de *T. atroviride* (Reithner et al, 2005, 2007), los genes del complejo velvet Vel 1, regulando la producción de gliotoxinas y la reproducción asexual en *T. virens* (Mukherjee and Kenerley, 2010). *Lae1* está involucrado en la producción de metabolitos secundarios relacionados con el micoparasitismo en *T. atroviride* P1 (Karimi et al., 2013), igualmente en *T. atroviride* unos de los trabajo en los cuales relacionan a las vías de MAPK con la regulación del metabolismo secundario es el trabajo hecho por Reithner y colaboradores (2007), que al mutar la MAPK Tmk1 aumenta la producción de muchos metabolitos secundarios entre ellos un compuesto ampliamente estudiado la 6-pentil-alfa-pirona.

A pesar de que se sabe mucho de los compuestos que producen los hongos del género *Trichoderma*, se sabe poco acerca de las rutas metabólicas utilizadas para su producción, de la regulación de las mismas y de cuál es el verdadero papel de estos compuestos en la biología de *Trichoderma*.

## 2.- Justificación

En el presente estudio usamos como modelo al hongo *T. atroviride*, ya que como hemos mencionado es un hongo de gran interés agrícola e industrial por la gran cantidad de propiedades benéficas que tiene y otorga para la protección de las plantas. Además reportes recientes hechos por integrantes de nuestro grupo de trabajo han profundizado en la respuesta de este hongo a daño mecánico, haciendo analogías con respuesta en animales y a plantas (Hernández-Oñate et al., 2012; Medina-Castellanos et al., 2014; Hernández-Oñate y Herrera-Estrella, 2015). Sin embargo a pesar de estos esfuerzos, no se ha visto si los metabolitos secundarios de *T. atroviride* participan en la respuesta a diferentes tipos de estrés ya caracterizados o al daño mecánico. *T. atroviride* como hongo común del suelo y organismo cosmopolita está expuesto al ataque de insectos o larvas micófagas, pero se desconoce si *T. atroviride* es capaz de responder o defenderse de este tipo de estrés, Dado el conocimiento alcanzado sobre la respuesta a daño, en este trabajo queremos analizar si ésta es la misma a micofagia por larvas de la mosca de la fruta *D. melanogaster* en *T. atroviride*, desde tres diferentes enfoques: metabólico, morfológico y genético. Igualmente nuestro interés como el de muchos grupos de trabajo es conocer rutas de regulación que nos provean información de cómo los hongos pueden responder a la micofagia.

### **3.- Hipotesis**

Las vías de MAPKs de *Trichoderma atroviride* están involucradas en la respuesta metabólica a daño mecánico y a depredación por insectos micófagos.

### **4.- Objetivo general**

Determinar si las vías de MAPK, relacionadas a estrés, están involucradas en la respuesta de *T. atroviride* a micofagia por larvas de *Drosophila melanogaster*

#### **4.1.- Objetivos particulares**

1. Caracterizar la respuesta morfológica de *T. atroviride* a micofagia
2. Determinar si las MAPKs Tmk1 y Tmk3 están involucradas en la respuesta a insectos micofagia.
3. Determinar si el patrón de metabolitos secundarios durante daño mecánico y micofagia involucra una respuesta específica.
4. Determinar si la expresión de genes relacionada con la producción de metabolitos secundarios es disparada por micofagia en *T. atroviride*.
5. Determinar si existe una comunicación cruzada entre larvas de *D. melanogaster* y *T. atroviride*.
6. Determinar el impacto de las interacciones con las cepas de *T. atroviride* en la supervivencia de las larvas de *D. melanogaster*.

## 5.- Materiales y métodos

### 5.1.- Cepas utilizadas.

Moscas adultas de *Drosophila melanogaster* SD-5, proporcionadas por el laboratorio de la Dr. Therese Markow.

*Larvas de Drosophila melanogaster* SD-5, en tercer instar.

*Trichoderma atroviride* IMI 206040

*Trichoderma atroviride*  $\Delta tmk1$ ,  $\Delta tmk3$

### 5.2.- Condiciones de crecimiento y preservación de las cepas utilizadas

*D. melanogaster* fue mantenida en medio agar banana a 25°C. Para la colecta de huevos las moscas fueron puestas en un colector con medio de cultivo agar harina, y se cambió la caja con los huevecillos cada 24 horas, para controlar el instar a utilizar.

Los hongos fueron mantenidos en forma de esporas colectadas de cultivos de las diferentes cepas utilizadas crecidas en Agar Dextrosa Papa, resuspendidas en agua.

### 5.3.- Medios de Cultivo

Agar Banana (Bacto agar (10 gr/l)+ Levadura de cerveza en polvo (36 gr/l( + Extracto de Malta (15 gr/l) + media banana + metil parabeno (200mg/ml))

Agar harina (Bacto agar (10 gr/l) + azúcar (30 gr/l) + Harina de Maíz (40 gr/l) + levadura de cerveza en polvo (36 gr/l) + metilparabeno (200mg/ml).

PDA (Agar dextrosa Papa)

YPDAC (PDA + extracto de levadura +Cas aminoácidos)

Medio Rosa de Bengala.

#### **5.4.- Colecta de larvas**

Las larvas se colectaron de las cajas de Petri con Agar Harina utilizando unas pinzas de disección de punta fina, las larvas se fueron poniendo en número de 20 en cajas de ELISA, para ser lavadas con solución salina (PBS 1X: Phosphate Buffered saline, NaCl (8 gr/l), KCl (0.2 gr/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.44 gr/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.24 gr/l) en agua destilada).

#### **5.5.- Interacciones *Drosophila-Trichoderma***

Para llevar a cabo las interacciones de larvas de *D. melanogaster* con las diferentes cepas de hongos, se inocularon 10000 esporas de cada hongo, dispersándolas en toda la caja de Petri, se cultivaron por 24 horas a 28°C en oscuridad (5 réplicas por hongo).

Pasadas las 24 horas de crecimiento de los hongos, se procedió a colectar 20 larvas por réplica de hongo utilizada, estas larvas se colocaron en las cajas de Petri, y se dejaron por otras 24 horas, bajo las mismas condiciones. Después de las 24 horas posteriores de las interacciones, se retiraron las larvas de caja Petri. Estas cajas se dejaron en incubación otras 24 horas y posteriormente se procedió a tomar fotografías.

Como control de daño, a las cajas con los hongos cultivados por 24 horas se les hizo daño mecánico con un molde de galletas, e igualmente se mantuvieron en incubación por otras 24 horas. Otros controles que se utilizaron, fueron las cepas cultivadas sin ningún tipo de daño, sólo se expusieron al aire durante un tiempo aproximado al que se tardaba en poner las larvas y/o se realizaba el daño mecánico.

#### **5.6.- Análisis de sobrevivencia de Larvas.**

Posterior a las interacciones con los hongos, las larvas de cada replica (5 réplicas) se colocaron en cajas independientes y se mantuvieron hasta que completarán su ciclo de vida (mosca adulta) y/o murieran, se cuantifico la cantidad de larvas vivas, larvas muertas, pupas y moscas adultas. Los resultados se analizaron por medio de una prueba de medias.

#### **5.7.- Análisis de preferencia de alimento (Food Choice)**

Los primeros análisis de “food choice” se realizaron en PDA en cajas de, los hongos se inocularon en lados opuestos de la caja y se cultivaron por 48 horas en oscuridad a 28°C en cajas de 150 ml.

Para la grabación de los videos se colectaron 20 larvas y se colocaron el en centro de la caja y se observó si estas preferían irse y estar en alguna de las cepas de hongos utilizadas.

Del total de larvas colocadas en cada caja se contaron cuáles permanecían al final del experimento en cada uno de los hongos y cuantas quedaban libres.

#### **5.8.- Análisis de no preferencia o repulsión: (“no choice”)**

Estos análisis se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones que los “food choice”, sólo que en este caso se cuantificaron las larvas que huían o que no eligieran ninguno de los hongos.

#### **5.9.- Respuesta de *T. atroviride* a las secreciones de las larvas**

Debido a que después de las interacciones de *T. atroviride* con las larvas, se observaba que el hongo dejaba de crecer o reducía su velocidad de crecimiento, nos dimos a la tarea de averiguar qué evento podría ser el responsable. Para esto primero colectamos larvas y las dejamos desplazarse sobre cajas de PDA durante 30 min, 1 hora y 24 horas, pasados estos tiempos retiramos la caja y se inóculo un millón de esporas de *Trichoderma* en el centro de la caja de Petri, se incubaron durante 72 horas y se tomaron las fotografías.

Debido a que obteníamos el crecimiento de diversas levaduras y bacterias en el medio PDA y probablemente este podría ser la causa del decremento del crecimiento de *T. atroviride* posterior al paso de las larvas por el medio de cultivo, decidimos usar el medio Rosa de Bengala (medio selectivo para *T. atroviride*), y realizar lo antes mencionado y verificar si efectivamente el efecto que se observa en el hongo es por los compuestos de las larvas o por los compuestos que puedan estar produciendo los microorganismos que se encuentran en el cuerpo y tracto digestivo de las larvas.

#### **5.10.- Supervivencia de *T. atroviride* en el cuerpo de *D. melanogaster*.**

Para analizar si *T. atroviride* era capaz de sobrevivir a la digestión por las larvas, se llevaron interacciones de 20 larvas con las cepas utilizadas durante 24 horas. Pasado el tiempo de interacción se colectaron las larvas y/o pupas y se esterilizaron por el método siguiente:

- 1- Lavar 2 veces con agua destilada estéril en agitación por 7 minutos, para quitar el exceso de esporas o micelio que pudiesen llevar adherido.

- 2- Lavar 2 veces con etanol al 70% en agitación por 7 minutos.
- 3- Lavar con cloro al 20% 3 veces en agitación por 7 minutos.
- 4- Lavar con agua destilada estéril 4 veces en agitación por 7 minutos.

Una vez que se tuvieron estériles las larvas y/o pupas, se colocaron en cajas con medio rosa de bengala.

### 5.11.- Extracción de DNA

Para la extracción de DNA del hongo, se crecieron las diferentes cepas en PDA con papel celofán durante 72 horas a 28 grados en oscuridad. Pasado este tiempo, se colectó el micelio con una espátula estéril y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido (todo en condiciones de oscuridad).

Se llevó a cabo el protocolo de Buffer Urea

Buffer urea

Urea 1M	76.2 g/l
NaCl 0.35M	58.44 g/l
Tris 0.5M	121.14g/l
EDTA 0.02M	
N-Lauril-sarcosina	1%
PH	8

- 1.- Colectar el micelio con una espátula estéril, y colocarlo en papel aluminio y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido.
- 2.- Macerar el micelio en un mortero estéril, con ayuda de un pistilo, agregando nitrógeno líquido, moler hasta obtener un polvo blanco.
- 3.- Colectar el micelio molido con ayuda de una espátula y colocar en tubos de 1.5ml estériles y volver a congelar en nitrógeno líquido.
- 4.- Sacar los tubos del nitrógeno líquido y colocarlos en una gradilla. Agregar 600µl de Buffer urea a cada tubo y mezclar por dos minutos en vortex.

- 5.- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- 6.- Agregar 600µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24-23-1)
- 7.- Mezclar en vortex por 10 minutos y centrifugar 15 minutos a 10,000 r.p.m
- 8.- Recuperar la fase acuosa y pasarla a un tubo nuevo
- 9.- Repetir los pasos 6-8
- 10.- Agregar un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24-1), centrifugar 15 minutos a 10,000 r.p.m.
- 11.- Recuperar la fase acuosa y agregar 5 µl de RNasa e incubar por 30 minutos a 37°C.
- 12.- Agregar un volumen de isopropanol frío y mezclar por inversión suavemente.
- 13.- Al mezclar se formara una hebra, la cual se recuperará con ayuda de un asa de vidrio o una punta de micro pipeta estéril y se coloca en un tubo nuevo.
- 14.- Lavar el DNA tres veces con 1ml de etanol al 70%, centrifugando 15 minutos a 10,000 r.p.m.
- 15.- Decantar el etanol y dejar secar el tubo a temperatura ambiente
- 16.- Resuspender el DNA en 50µl de agua destilada estéril.

#### **5.12.- Extracción de RNA y RT-PCR**

Debido a que los RNAs se utilizarían para realizar RT-PCR y RT-PCR en tiempo real, se llevaron a cabo interacciones de *T. atroviride* WT con larvas de *D. melanogaster* a diferentes tiempos (30 min, 1 hora y 24 horas), esto para analizar si los genes seleccionados se inducen a tiempos tempranos o tiempos largos durante la interacción con las larvas.

Las interacciones se realizaron como se mencionó anteriormente, pasados estos tiempos, se retiraron las larvas y se colectó el micelio con ayuda de una espátula estéril, el micelio se congelo inmediatamente en nitrógeno líquido, se maceró por medio de un mortero y un pistilo estéril, añadiéndole nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo blanco. El micelio molido



se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml. Esto se realizó igualmente para analizar la respuesta a daño mecánico, haciendo daño con una hoja de bisturí estéril.

La extracción de RNA se llevó a cabo por medio del método de TRIZOL de Invitrogen, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para realizar los RT-PCR primero se llevó a cabo la síntesis de cDNA de todas las muestras por medio del método: First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT de Invitrogen, como primer paso se trató el RNA (1µg) con DNasa I Amp Grade de invitrogen, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Posterior a la síntesis de cDNA se realizaron PCR para todos los genes seleccionados, usando como control el gen de la DNA polimerasa de la familia B (ID: 53190), y utilizando el protocolo para Taq DNA polymerase (recombinant) de Thermo scientific.

### **5.13.- Determinación de metabolitos secundarios (Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Robert Winkler, con la ayuda de la M.C Abigail Moreno)**

El crecimiento de *T. atroviride* se llevó a cabo en medio agar dextrosa papa (PDA), este medio es recomendado para la inducción de metabolitos secundarios, el crecimiento fue sobre papel celofán estéril a 26°C en oscuridad por 48 horas.

Para la extracción de metabolitos secundarios se llevó a cabo el protocolo reportado por J.C. Frisvad.

- 1.- Colectar el micelio de la caja de Petri con ayuda de una espátula estéril, y colocar en un tubo eppendorf estéril de 2ml y pesar el micelio.
- 2.- Extraer los metabolitos secundarios con ethyl acetato, metanol y diclorometano en una concentración de (3:2:1 respectivamente) y ácido fórmico al 1%.
- 3.- Ultrasonicar por 50 min y transferir a un tubo Nuevo de 1.5 ml. Evaporar el contenido y re disolver en 400 µl de metanol, ultrasonicar por 10 minutos y filtrar con un filtro de 0.45µm mantener a -18°C hasta el análisis.

#### **5.14.- Medición**

La medición de metabolitos secundarios se llevó a cabo por micro inyección directa al espectrómetro de masas (Espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones / de laboratorio / PMT / de alta resolución LTQ XL™ Thermo Scientific).

#### **5.15.- Medición de compuestos volátiles.**

El crecimiento de las cepas de *T. atroviride* se llevó a cabo igualmente en placas de medio agar dextrosa papa (PDA), con celofán, se dejó crecer durante 48 hrs a 26°C en oscuridad.

La medición de compuestos volátiles se llevó a cabo por medio de LTP-MS (plasma de baja temperatura acoplado a un espectrómetro de masas), tomando el celofán con ayuda de unas pinzas de disección y colocándolo en una base de vidrio y sellando los contornos con cinta adhesiva transparente y se colocaron las muestras bajo el plasma. Las condiciones utilizadas fueron cuatro:

- 1.-Condición control *T. atroviride* o mutantes crecido sobre celofán sin ninguna alteración
- 2.- Medición con daño a 10 minutos y 30 minutos (con ayuda de un bisturí se le indujo daño a la colonia de *T. atroviride* y pasados 10 y 30 minutos se midieron los compuestos volátiles.
- 3.- Medición durante micofagia. Se colectaron 10 larvas de *D. melanogaster* en tercer instar y se colocaron sobre el cultivo de *T. atroviride*, después de 10 minutos se realizó la medición de compuestos volátiles.
- 4.- Las muestras se colocaron a menos de 1 cm de distancia con el plasma (el gas utilizado para ionizar los compuestos volátiles fue helio), las mediciones hechas fueron en un rango de masas de 50 a 1000. La temperatura del capilar era de 100°C.

Condiciones del LTP:

Flujo de helio 300 mL

Voltaje de entrada del circuito generador de alto voltaje 10V

Voltaje de salida del circuito 8000V aproximadamente

Análisis de los datos de los metabolitos analizados.

Se tomaron 10 microscans por muestra, están se colocan en un pipeline usando el programa de Toppas.

Los pasos seguidos son:

a) Convertir archivos  
archivo de entrada \*.raw  
archivo de salida \*.mzML

b) Sumar scan por muestra

Se suman los 10 microscan para dar lugar a 1 scan

c) Generar un pick picking, lo que significa que se eliminan los datos que tengan una intensidad menor al % de la intensidad total, los datos que pasen este umbral se les asigna m/z.

d) Generación de matriz m/z e intensidad

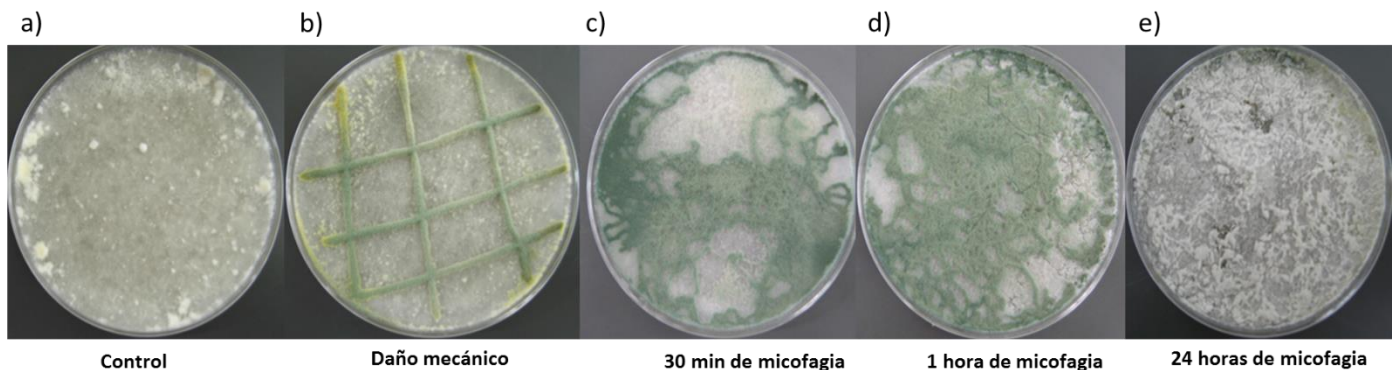
e) El archivo se guarda en formato \*.csv

## 6.- Resultados

### 6.1.- La micofagia por larvas de *D. melanogaster* induce una respuesta morfológica similar a la observada por daño mecánico en *T. atroviride*.

En reportes generados anteriormente por Hernandez-Oñate y colaboradores (2012), se analizó la respuesta de *T. atroviride* a daño mecánico, en la cuales se observó que 48 horas después de hacerle daño al micelio con un bisturí, se producían esporas en el área que había sido dañada. El enfoque biológico de la respuesta a daño mecánico en hongos puede ser la defensa contra posibles depredadores (insectos micófagos), por esta razón decidimos analizar si *T. atroviride* era capaz de responder a la depredación por larvas de *D. melanogaster*.

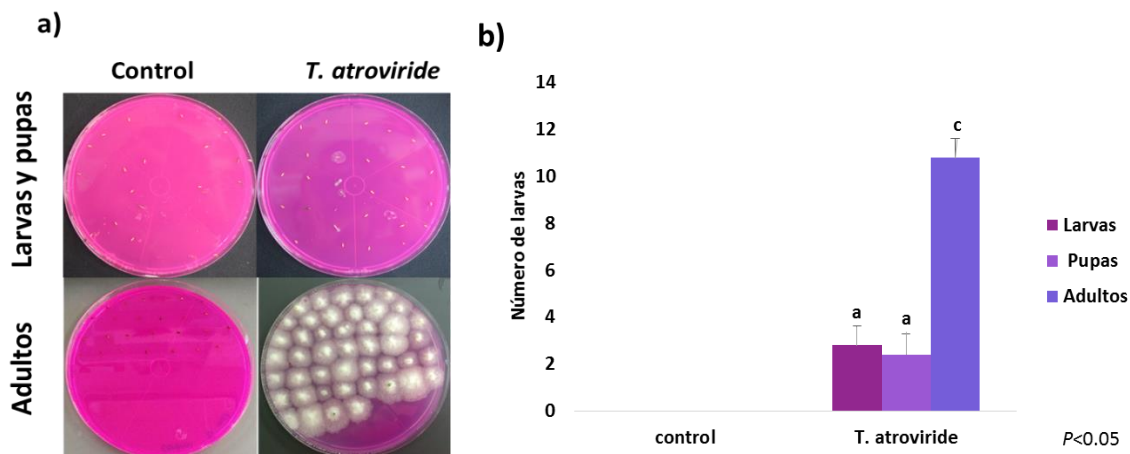
Con este propósito se realizaron ensayos de interacción entre *T. atroviride* y *D. melanogaster* (materiales y métodos), pasadas las 48 horas después de retirar las larvas se observó que para los tiempos cortos de interacción de 30 minutos y 1 hora, se producían conidios en el área donde habían estado desplazándose las larvas (Figura 3 c,d), una respuesta similar a la observada en el daño mecánico (Figura 3b). Para el caso de las interacciones realizadas durante 24 horas, se observa una disminución en la respuesta (producción de conidios). En este caso, también se producen conidios en el área dañada; sin embargo, es tanto el daño producido por las larvas que puede ser que se esté retardando la maduración de las esporas comparado con el daño mecánico (Figura 3e)



**Figura 3:** Respuesta morfológica de *T. atroviride* al daño mecánico (b) y micofagia a diferentes tiempos (c-e), comparados con la condición control

Una vez que se comprobó que en efecto las larvas provocaban daño al micelio de *T. atroviride* y que este era capaz de responder a dicho daño produciendo esporas, se quiso analizar si *T. atroviride* era capaz de sobrevivir a la digestión de las larvas. Para esto, se realizaron interacciones durante 24 horas en oscuridad, pasado este tiempo se colectaron las larvas de las cajas de Petri (incluyendo a las larvas que ya habían pasado a la fase de pupa). Las larvas y/o pupas se esterilizaron, como se mencionó en materiales y métodos y se inocularon en cajas de Petri con medio selectivo para *T. atroviride*; se utilizó un medio selectivo, para asegurarnos que lo que emergiera del cuerpo de las larvas fuera en efecto *Trichoderma*.

Como se puede observar en la figura 4a el crecimiento de *T. atroviride*, emergiendo del cuerpo de las larvas (~3 por réplica) y pupas (~2 por réplica) es menor al del crecimiento de cuerpos de moscas adultos (~10 por réplica), en la grafica de la Figura 4b, se muestra la cuantificación del crecimiento de *T. atroviride*.



**Figura 4.-** a) Emergencia de *T. atroviride* de los estadios de las larvas de *D. melanogaster* en medio selectivo para *Trichoderma* b) cuantificación de los cuerpos de donde emergió *T. atroviride*. Se usaron 20 larvas por experimento, realizando tres réplicas.

## 6.2.- El daño mecánico induce cambios en la producción de metabolitos secundarios de *T. atroviride*

Existen reportes acerca de que algunos cuerpos fructíferos de algunos hongos macromicetos, producen ciertos compuestos de forma constitutiva que pueden ser tóxicos para diversos organismos, también se ha observado que aquellos hongos que producen compuestos en forma inactiva, al inducirles daño mecánico, se induce la producción de la forma activa que

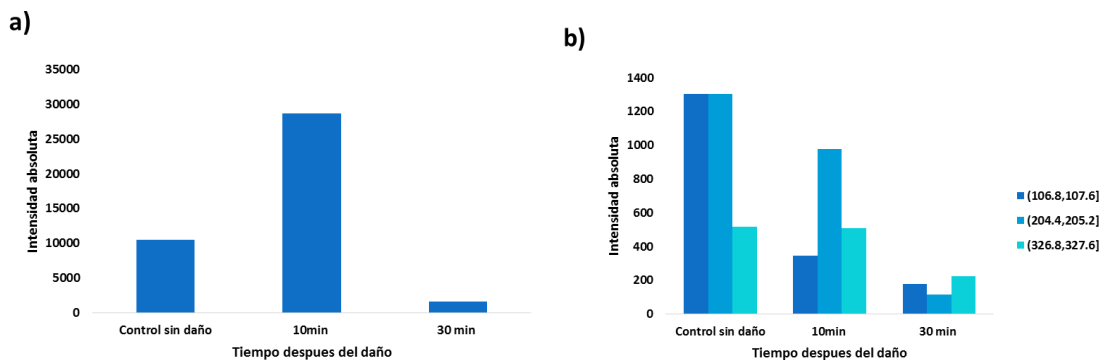
igualmente es tóxica para algunos organismos (bacterias, hongos, insectos, algunos mamíferos pequeños).

Para saber si los metabolitos secundarios participan en la respuesta a daño mecánico y micofagia en *T. atroviride*, se realizó la medición de compuestos volátiles producidos después de hacerle daño mecánico al micelio del hongo con un bisturí o después de colocarle larvas para que estas lo depredaran.

Unos de los compuestos más abundantes producidos por *T. atroviride* es la 6-pentyl-alpha-pyrone, este compuesto se ha descrito que tiene actividades antibióticas, antifúngicas, y que es capaz de promover el crecimiento de las plantas a bajas concentraciones, mientras que en altas concentraciones puede retardar su crecimiento. Este compuesto tiene una masa carga (m/z) de 167 aproximadamente, al analizar los compuestos volátiles, encontramos que un compuesto con esta masa carga se estaba produciendo con gran intensidad. Debido a su abundancia tomamos este compuesto como referencia para comparar su producción entre daño mecánico y micofagia y comparar con la producción de otros compuestos posibles.

Lo primero que se analizó fue la producción de compuestos volátiles en respuesta a daño mecánico, para esto se le hizo daño al micelio de *T. atroviride* y pasados 10 y 30 minutos se midieron compuestos por medio de LTP-MS (plasma de baja temperatura acoplado a masas). Se realizaron tres mediciones de cada tiempo de daño y de los datos que generó el espectrómetro de masas como salida, se convirtieron a un formato con el cual pudiéramos analizar la intensidad absoluta de cada uno de los iones obtenidos (formato .xlsx).

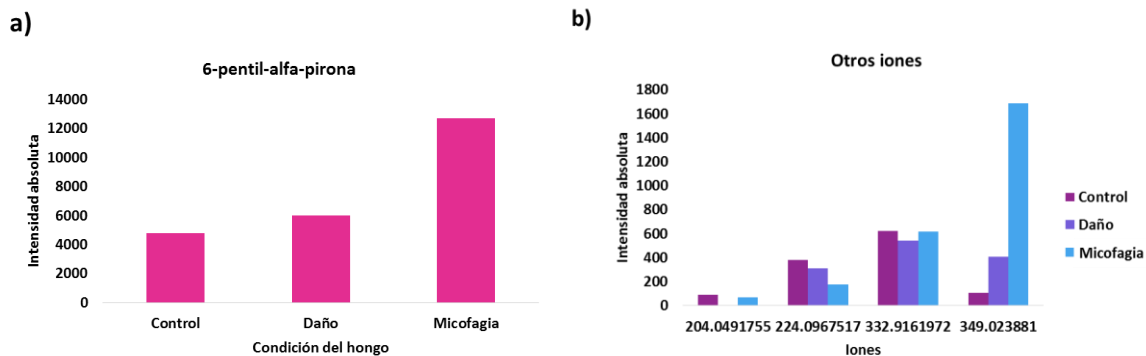
En la figura 5 se muestran dos gráficas en las cuales se compara la producción de aquellos iones que tenían mayor intensidad absoluta o que tenían más cambios con respecto al tiempo de daño comparado con la condición control, la figura 5a muestra la producción de 6PP bajo una condición control y a diferentes tiempos después de hacerle daño mecánico a diferentes tiempos, observándose un incremento en la producción de 6PP a los primeros diez minutos, y que al pasar más tiempo esta producción disminuye (30 minutos), incluso más que en el control. En la figura 5b se muestra la producción de tres iones con diferente masa carga y los cambios en intensidad con respecto al tiempo después del daño.



**Figura 5.-** Producción de compuestos a diferentes tiempos después de daño mecánico. a) grafica de la producción de 6-pentyl-alfa-pyrone comparando la producción en el control y a 10 y 30 minutos después del daño, b) producción de tres iones con masa carga de 106.8-107.6, 204.4-205.2 y 326.8-327.6, en el control y 10 y 30 minutos después de hacerle daño al micelio.

Como parte del enfoque biológico de la respuesta a daño mecánico es como se ha mencionado anteriormente, analizar la respuesta de *T. atroviride* a depredación. Como se vio el daño mecánico al micelio de *T. atroviride* induce la sobreproducción de ciertos compuestos y la inhibición de otros, lo que nos sugiere un papel muy importante de los compuestos volátiles en la respuesta a herida. Tomando esto como referencia se llevaron a cabo interacciones de *T. atroviride* con larvas de *D. melanogaster* y se analizó por medio de LTP-MS la producción de compuestos volátiles en respuesta a esta reto.

En las gráficas de la figura 6a se muestra la comparación de la producción de los iones descritos anteriormente durante daño mecánico y micofagia, debido a la intensidad tan alta mostrada en la producción de la 6PP se decidió realizar los análisis por separado y se muestran en gráficas independientes. Se observa un aumento en la producción de la mayoría de los compuestos en respuesta al daño mecánico, pero esta se ve aún más incrementada en micofagia excepto para los iones con m/z de 204.0491755 y 224.0967517 (Figura 6b).



**Figura 6.-** Gráficas de comparación en la producción de volátiles de *T. atroviride* durante daño mecánico y micofagia. Gráfica a) Producción dada como intensidad absoluta de 6PP en daño mecánico y micofagia. Gráfica b) Producción dada como Intensidad absoluta de las m/z de: 204.04, 224.09, 332.91 y 349.02, durante daño mecánico y micofagia.

### 6.3.- Selección de genes para la realización de RT-PCR y RT-PCR en tiempo real

Debido a que nos interesaba analizar la respuesta metabólica de *T. atroviride* al daño mecánico, buscamos en la literatura genes que estuviesen involucrados en la producción de metabolitos secundarios (Bok y Keller, 2004), genes de *T. atroviride* dentro de los que se encuentran el regulador maestro de metabolismo secundario, una putativa metil transferasa *LaeA* (ID en *T. atroviride*: 319344), (Bok y Keller, 2004, Karimi, et al., 2013), algunos factores de transcripción conocidos como proteínas bZIP que se sabe funcionan como mediadores de vías en respuesta a estrés en *A. nidulans* y algunos como *rsmA* que recupera la producción de aflatoxina en mutantes de *A. nidulans* para *LaeA*.

En investigaciones anteriores en el laboratorio a cerca de la respuesta de *T. atroviride* a daño mecánico, Hernández-Oñate, realizo transcriptomas de la respuesta a tiempos cortos (15 a 360 minutos) encontramos que dos bZIP estaban siendo (ID 314604, 182347), inducido y reprimido por el daño mecánico, respectivamente, mientras que otros dos bZIP (ID en *T. atroviride*: bZIP *napA*: 39837, bZIP *rsmA*: 300980) fueron seleccionados por ser ortólogos a los de *A. nidulans rsmA* y *napA* (Tabla 1), así mismo se decidió realizar RT-PCR de los genes correspondientes para  $\Delta tmk1$ ,  $\Delta tmk3$  RT-PCR.



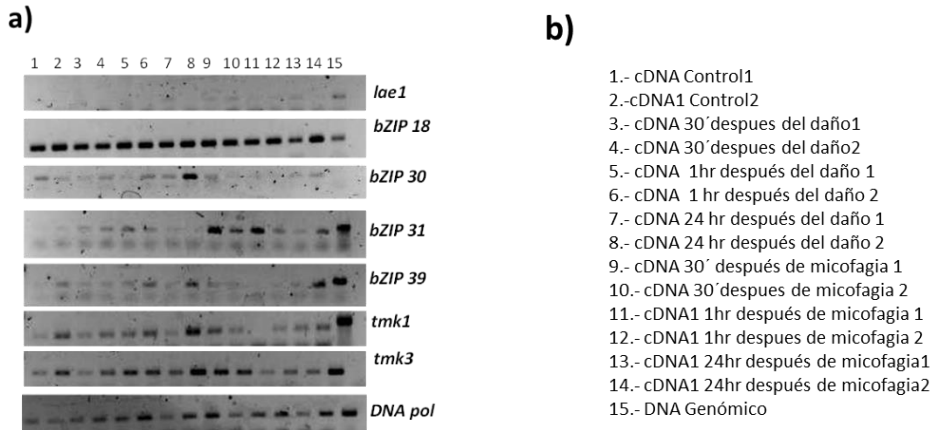
Como ya se mencionó se llevó a cabo la selección de varios genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios como son los factores de transcripción bZIP y la “metil transferasa” *lae1*. En la tabla 1 se enlistan los genes seleccionados, su ID en el genoma de *T. atroviride* y la función propuesta.

Tabla 1.- Genes seleccionados para la realización de PCR en tiempo real.

Gen	ID <i>T. atroviride</i> v2	Función
bZIP	182347	Metabolismo secundario
bZIP	39837	Metabolismo secundario
bZIP	301441	Metabolismo secundario
bZIP	314604	Metabolismo secundario
<i>Lae1</i>	319344	Supuesta metil transferasa

#### 6.4.- El daño mecánico y la micofagia, inducen cambios en la expresión de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios

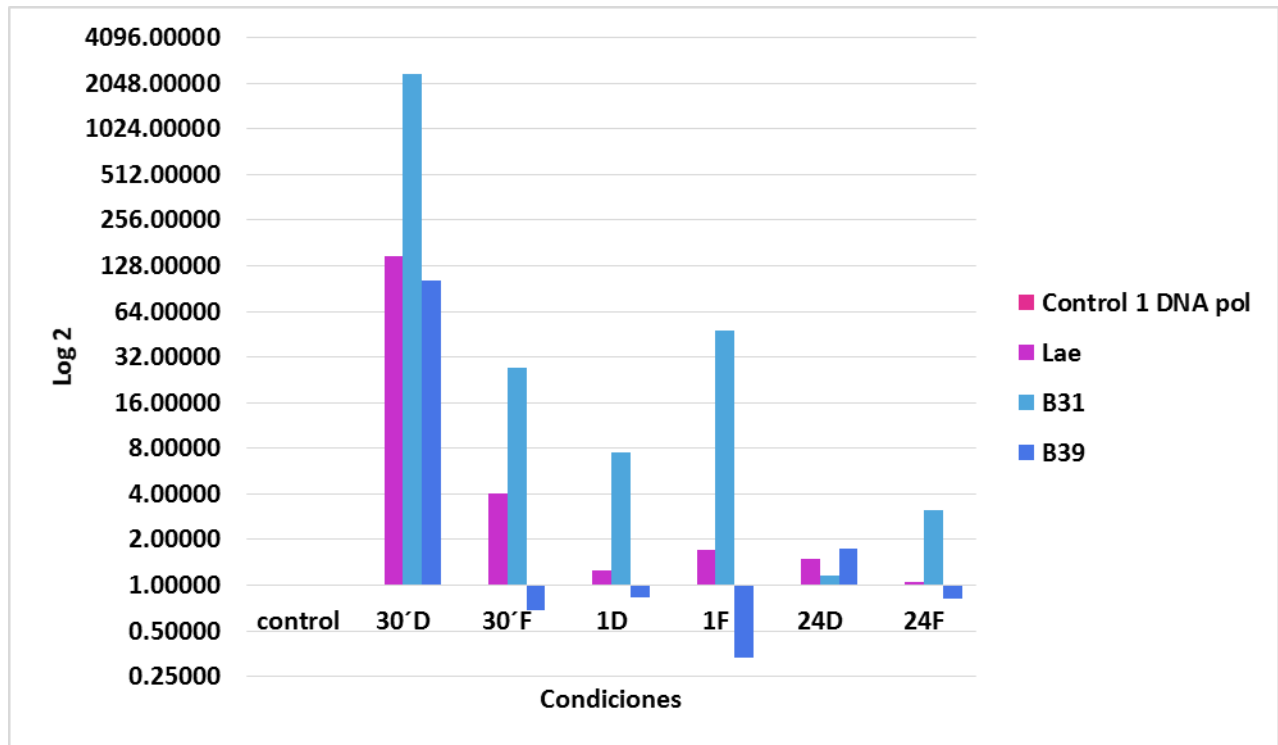
Para determinar los niveles de expresión de los genes seleccionados (Tabla1), durante el daño mecánico y la micofagia, decidimos llevar a cabo primero experimentos de RT-PCR en tiempo final para elegir algunos genes candidatos para analizar solo genes seleccionados por indicios de expresión diferencial bajo estas condiciones por medio de PCR en tiempo real. Como se puede ver en la Figura 7, vemos presencia de *lae1*, solo bajo condiciones de micofagia, mientras que para bZIP31 y bZIP39, observamos aumento en la intensidad de la banda en las condiciones de micofagia comparadas con las condiciones de daño mecánico.



**Figura 7.-** RT-PCR en tiempo final de genes de *T. atroviride*. a) RT-PCR de cuatro factores de transcripción bZIP, de *lae1* y de las MAPK *tmk1* y *tmk3* utilizando como control el gen de la DNA polimerasa, los números en la parte superior indican las condiciones y réplicas enlistadas en la figura b).

Con base en los resultados de este análisis por medio de PCR punto final, se seleccionaron los genes: *lae1*, *bZIP30*, *bZIP31*, *bZIP39*, debido a que observamos cambios en el producto final durante daño mecánico y micofagia a los diferentes tiempos usados y el control de la DNA polimerasa, para llevar a cabo RT-PCR cuantitativos. Estos últimos se enviaron a realizar al laboratorio de Servicios Genómicos de la Unidad de Genómica Avanzada.

Debido a que el gen *bZIP 30* daba como resultado dos bandas, decidimos quitarlo de los ensayos finales. Al analizar los resultados se observa que tanto el daño mecánico como la micofagia causan cambios en la expresión de los genes seleccionados, como se muestra en la figura 8. Se observa que la expresión de los genes *lae1*, *bZIP31* y *bZIP 39* se dispara a los 30 minutos de daño mecánico, mientras que en micofagia, esta expresión esta disminuida, y que incluso el gen *bZIP39* deja de expresarse; para el tiempos posteriores 1 hora y 24 horas de las condiciones, se reduce la expresión de los genes, pero donde más se afecta la expresión de los genes, es bajo las condiciones de micofagia y que el gen *b39*, es el más afectado en estas condiciones ya que deja de expresarse. (Figura 9)



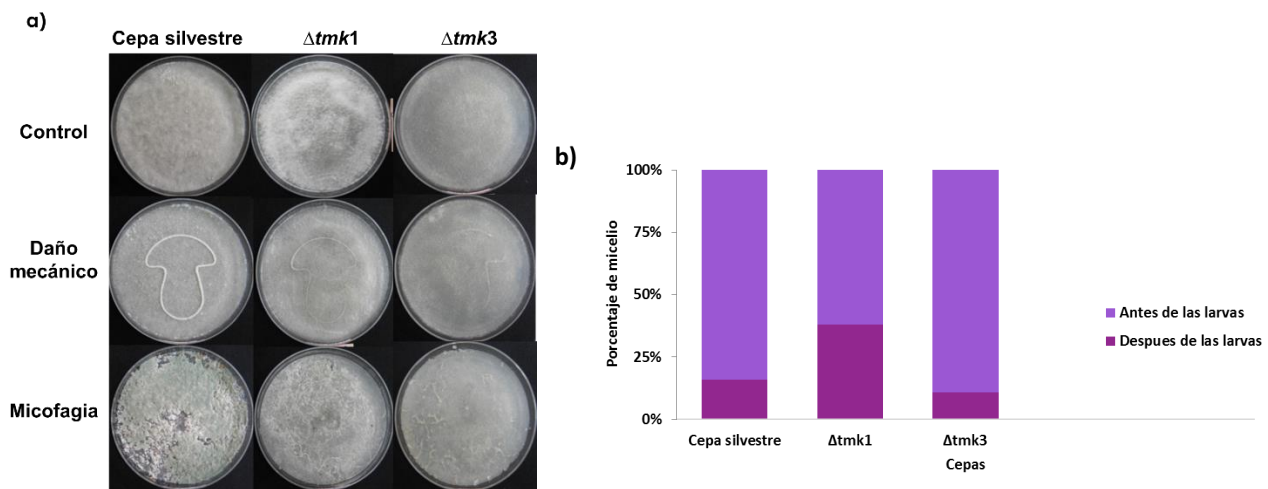
**Figura 8.-** PRC en tiempo real de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios a diversos tiempos en las condiciones de daño y de micofagia. 30'D (30 minutos después del daño), 30'F (30 minutos después de micofagia), 1D (1 hora después de daño), 1F (1 hora después de micofagia), 24D (24 horas después de daño), 24F (24 horas después de micofagia). B31: gen bZIP 314604 B39: gen bZIP 39837.

### 6.5.- La mutante $\Delta tmk3$ es más susceptible a la micofagia por larvas que la cepa silvestre

Anteriormente, Medina-Castellanos y colaboradores (2014) analizaron el papel de las MAPKs de *T. atroviride* en daño mecánico, ya que las mutantes de las MAPK  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$ , eran incapaces de producir esporas en respuesta a daño. Sin embargo, aunque se ha estudiado diversos papeles de las MAPK, aún se desconoce cuáles son todos los procesos que pueden ser regulados por ellas. Por ello, utilizamos las mutantes de las MAPKs  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  para analizar su respuesta durante la interacción con larvas, desde la respuesta morfológica, respuesta metabólica y la respuesta genética como se mencionó anteriormente para la cepa silvestre.

En la figura 9 a se muestra la respuesta de la mutantes al realizar interacciones con larvas de *D. melanogaster*, y usando como control la respuesta a daño mecánico. Se puede observar que al igual que en el daño mecánico, después de la micofagia, estas mutantes también son incapaces de producir esporas como la cepa silvestre.

Después de la micofagia, se observó que la densidad de masa micelial en la mutantes disminuía considerablemente, por lo que se realizó el pesado de micelio después de la interacción con las larvas, en la gráfica de la figura 9b se muestra el pesado de micelio de las cepas mutantes y de la cepa silvestre antes y después de la micofagia. Como se puede observar las larvas reducen en mayor porcentaje el micelio de la mutante  $\Delta tmk3$  con respecto a su peso inicial y comparando con la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$ . Para esta última se observa que las larvas disminuyen menos el porcentaje de micelio comparado con la cepa silvestre.



**Figura 9.-** Análisis morfológico de la respuesta a daño mecánico y a micofagia. a) respuesta morfológica de las cepas mutantes al daño mecánico y a micofagia, comparándolas con la respuesta de la cepa silvestre. b) Gráfica de peso de micelio antes y después de la interacción con larvas expresada en porcentaje con respecto a su peso inicial y su peso final.

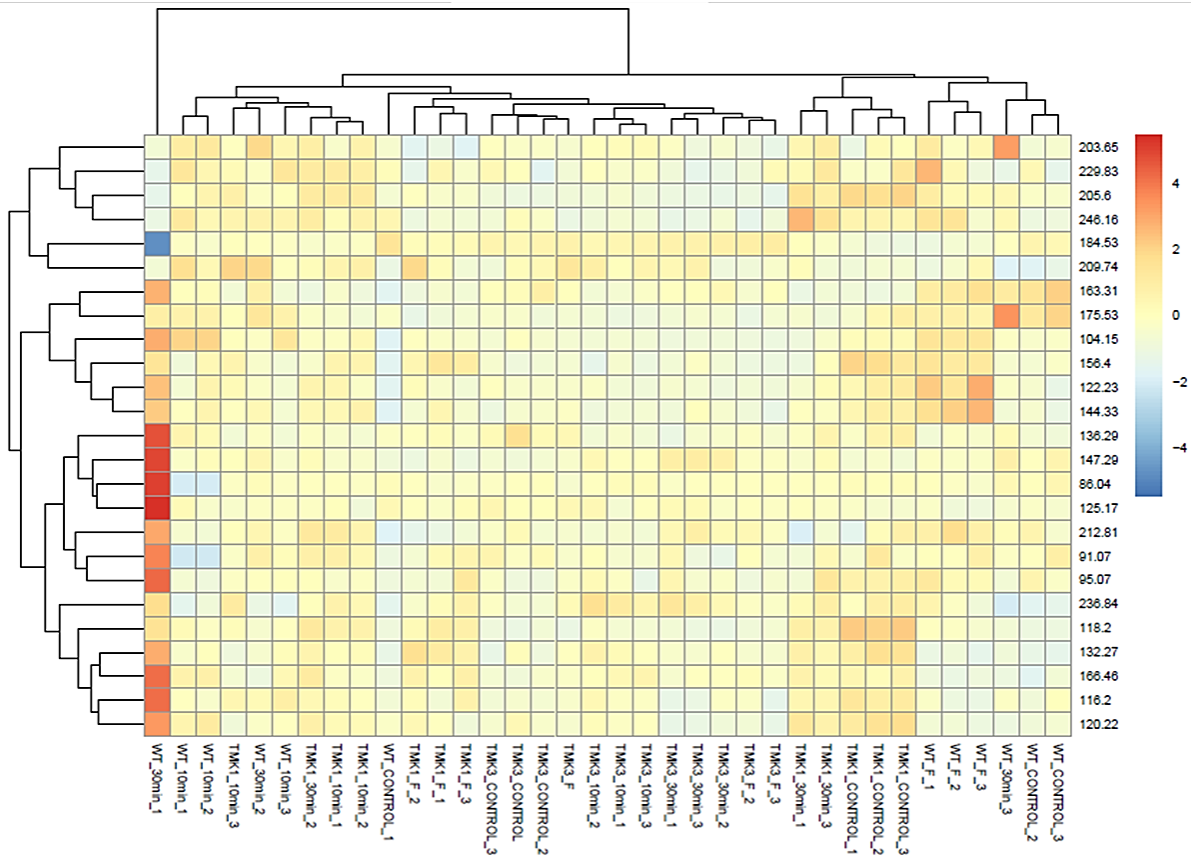
### 6.6.- La mutante $\Delta tmk3$ produce menos metabolitos secundarios que la cepa silvestre

Al igual que en la cepa silvestre, nos interesaba saber cuáles eran los compuestos producidos por las mutantes en respuesta al daño mecánico y a micofagia, tanto compuestos totales, como compuestos volátiles. Para esto se realizó primero una extracción total de metabolitos secundarios de las cepas utilizadas. Para poder analizar todos los iones detectados en el espectrómetro de masas, debido a que las mayores diferencias se observaban en los iones más pequeños o con masa carga de 50 a 500, se tomó este rango de  $m/z$  para realizar los mapas de calor y comparar la intensidad de los iones bajo las diferentes condiciones. Además para realizar este análisis se incluyeron las réplicas realizadas para cada muestra. La figura 10 muestra el mapa de calor realizado con el rango de masas de 50 a 500, donde se observa una agrupación de todas las condiciones de la mutante  $\Delta tmk3$  en el centro. En esta

agrupación se puede observar que en esta mutante en la mayoría de las condiciones hay una reducción en la producción de la mayoría de los iones detectados, independientemente de la condición de muestreo. En contraste, con la mutante  $\Delta tmk1$  se observa un aumento en la intensidad de los iones sin importar la condición.

Cabe destacar que al analizar cada uno de los iones y sus intensidades en el mapa de calor notamos que en la mutante  $\Delta tmk3$  algunos iones con m/z de 209, 236, 136 tienen mayor intensidad que en la cepa silvestre. El ion con m/z 209 se produce más durante la condición control y los diferentes tiempos de daño, mientras que en la cepa silvestre no se produce. El ion m/z 326 se produce más en las condiciones de daño y micofagia en la mutante  $\Delta tmk3$ , mientras que en la cepa silvestre en la condición de control y micofagia no se producen o se producen en menor intensidad. Para el ion con m/z de 136 se observa un aumento en la intensidad en la mutante  $\Delta tmk3$  bajo la condición de control, mientras que en la cepa silvestre este compuesto no se produce bajo la misma condición.

Otros iones que destacan en la comparación de la mutante  $\Delta tmk3$  y de la cepa silvestre son aquellos con m/z de 132,166, 116 y 120, en estos compuestos se conserva su intensidad a los 10 minutos de daño, tanto en la mutante como en la silvestre, no así para las condiciones control, 30 minutos de daño y micofagia.



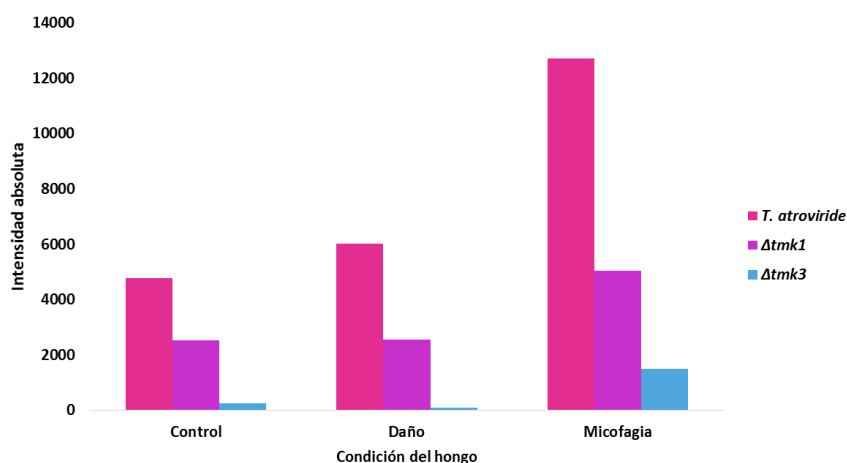
**Figura 10.-** mapa de calor de iones con m/z con un rango de 50 a 250 (eje de las y) para las mutantes  $\Delta tmk1$ ,  $\Delta tmk3$  y la cepa silvestre bajo las condiciones control, 10 y 30 minutos de daño mecánico y micofagia (eje de las x). La barra de color de en la parte superior derecha indica la intensidad de los iones desde -4 a 4.

**6.7.- La mutante  $\Delta tmk3$  produce menos compuestos volátiles que la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$**

En base a reportes hechos por Reino y colaboradores (2008) y Stoppacher y colaboradores (2010), que reportan metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma*, encontramos algunos iones con actividad insecticida que podrían estar participando en la defensa de *T. atroviride* contra la depredación por larvas y/o en la producción de conidios, estos compuestos son algunos sesquiterpenos y compuestos de ocho carbonos que se sabe participan en el proceso de esporulación, por ultimo analizamos al igual que en la cepa silvestre la producción de la 6PP. La masa carga encontrada en la literatura para los sesquiterpenos es de m/z 204, m/z 233 para otro sesquiterpeno conocido como cyclonerodiol y m/z 333, 349 para los compuestos de 8 carbonos, y para la 6PP de m/z 166-167.

Al igual que en los análisis realizados para la cepa silvestre en la medición de compuestos volátiles, se realizó para los volátiles anteriormente mencionados para las mutantes

$\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$ , debido a que la intensidad en la producción de la 6PP sobrepasa la producción de los demás compuestos, decidimos mostrar en un gráfico por separado. En la figura 11, se puede observar que para la cepa silvestre y como ya se mencionó anteriormente, la producción de la 6PP aumenta después de hacerle daño mecánico. Sin embargo, después de la interacción con larvas la producción aumenta notablemente comparado con el control y el daño mecánico. En las mutantes no vemos un aumento en la producción de la 6PP después del daño mecánico, por ejemplo en la mutante  $\Delta tmk1$ , la producción se mantiene sin cambios, mientras que en la mutante  $\Delta tmk3$  la producción disminuye. Para la respuesta a micofagia, tenemos un comportamiento similar al observado en la cepa silvestre, debido a que también aumenta la producción de 6PP después de la interacción con larvas, comparándolo con sus respectivos controles. Cabe destacar que las mutantes se ven gravemente afectadas en la producción de este compuesto, ya que se puede observar disminución en el control de la mutante  $\Delta tmk1$  y para la mutante  $\Delta tmk3$ , la producción de este compuesto es casi nula, para la condición control.

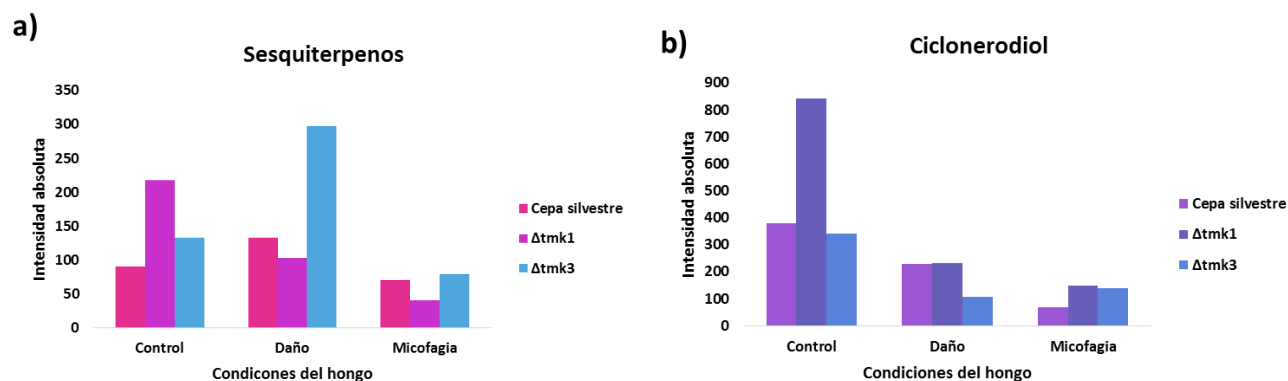


**Figura 11.-** Comparación en la producción de 6PP entre la cepa silvestre y las mutantes durante daño mecánico y micofagia

Otros de los compuestos que analizamos fueron los sesquiterpenos, que como ya se ha descrito, estos compuestos se caracterizan entre otras cosas por tener actividades insecticidas contra una amplia gama de insectos. Por ello, analizamos la producción de estos compuestos en la condición control y después de daño y de micofagia. Para poder mostrar un gráfico adecuado, estos compuestos los dividimos en sesquiterpenos totales (figura 12a) y debido a su producción y su masa carga superior al cyclonerodiol (figura 12 b). Los resultados que esperábamos conforme a la producción de estos compuestos y su especificidad es que la

intensidad en la producción de estos compuestos no fuera disparada por el daño mecánico y sí por la micofagia. Sin embargo, lo que observamos fue que se disparaba la producción de estos compuestos en daño mecánico y no en micofagia, para el caso de la cepa silvestre y de la mutante  $\Delta tmk3$ , en esta última la producción es muy superior a la de la cepa silvestre, mientras que en la mutante  $\Delta tmk1$ , se produce más de estos compuestos en la condición control, observándose una disminución después del daño mecánico y aún más después de micofagia (Figura 12 a).

En la producción del ciclenerodiol observamos un comportamiento similar entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$ , ya que baja la intensidad de la producción después del daño mecánico comparado con la condición control, cabe destacar que la mutante  $\Delta tmk1$  produce una gran cantidad de este compuesto en la condición control. Después de la micofagia en estas dos cepas disminuye mucho más la producción de este compuesto comparado con el daño mecánico y la condición control. Mientras que para la mutante  $\Delta tmk3$  igualmente baja la producción de este compuesto después de hacerle daño con respecto a la condición control, mientras que en micofagia aumenta ligeramente la producción de ciclenerodiol, comparando con la producción después del daño (Figura 12 b).

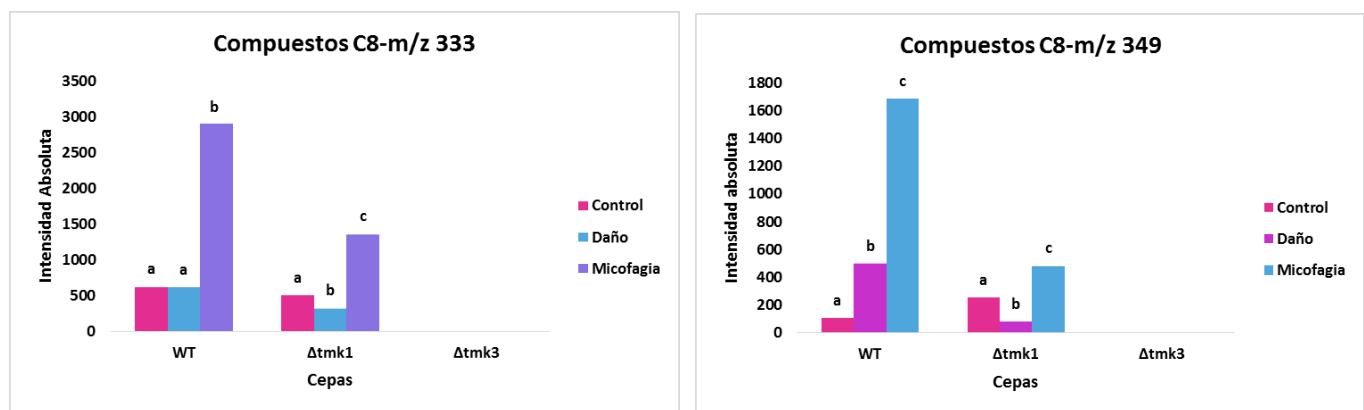


**Figura 12.-** a) Producción de sesquiterpenos totales en la cepa silvestre y en las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  en condiciones control daño mecánico y micofagia. b) Producción de ciclenerodiol en la cepa silvestre y en las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  en condiciones control daño mecánico y micofagia.

Los compuestos de ocho carbonos en *T. atroviride* se ha descrito que participan en la esporulación en éste y en otros hongos (Nemcovic et al.,2008). Como se ha mencionado una de la respuesta de *T. atroviride* a daño mecánico es la producción de esporas e igualmente cuando lo ponemos en interacción con larvas de *D. melanogaster*. Se propone entonces que



estos compuestos aumenten en producción en estas dos condiciones. Para esto, dentro de los análisis de mediciones de compuestos volátiles encontramos unos compuestos que por su masa carga pueden ser estos compuestos de ocho carbonos. Las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  están afectadas en la producción de esporas después del daño mecánico y durante micofagia, entonces esperábamos que estos compuestos se produjeran en menor cantidad con respecto a la silvestre. La figura 13 a-b muestra la producción de compuestos de ocho carbonos con masa carga de 333 y 349, se puede observar que para la cepa silvestre en las condiciones control y daño este compuesto se produce en igual intensidad (no así para los de m/z de 349 donde aumenta su producción después de daño), mientras que durante micofagia la producción aumenta de manera importante. En la mutante  $\Delta tmk1$ , se observa una disminución en la producción después del daño e igualmente aumenta la producción durante micofagia, con respecto a su control. La mutante  $\Delta tmk3$  es por demás interesante ya que parece no producir estos compuestos bajo ninguna condición o los produce en niveles indetectables mediante nuestra aproximación.

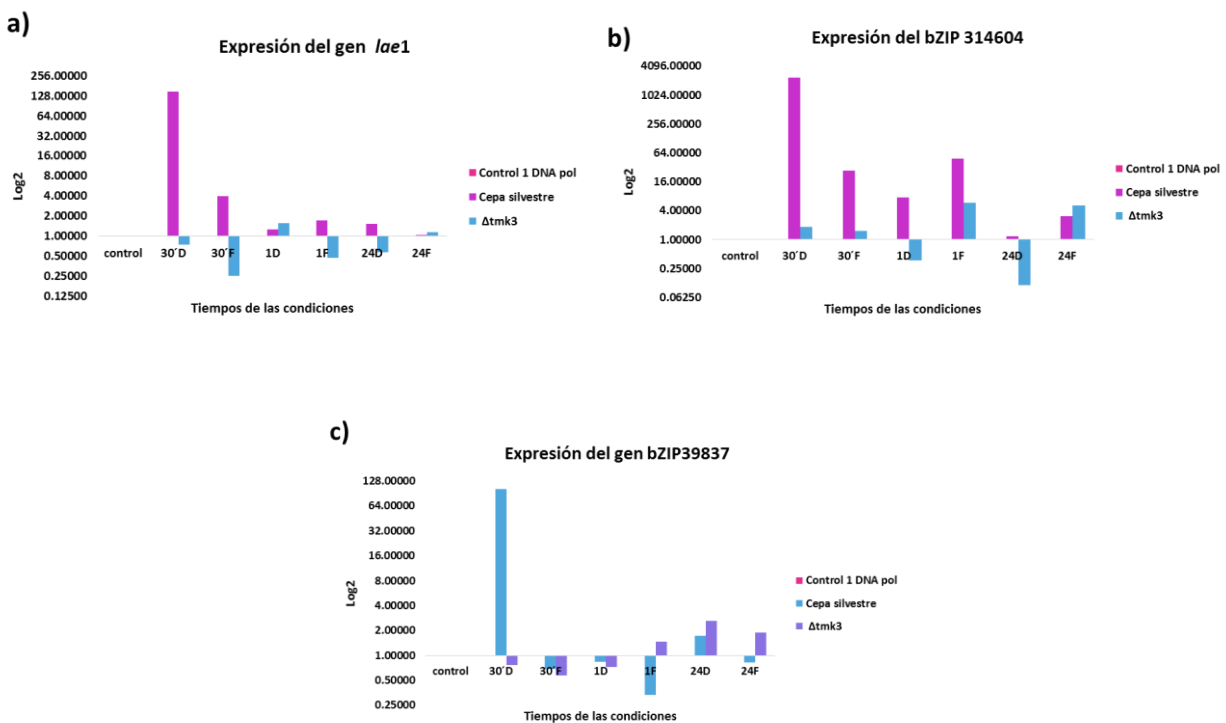


**Figura 13.-** a) Producción de compuestos de ocho carbonos con m/z de 333 en la cepa silvestre y en mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  en las condiciones control, daño y micofagia. b) Producción de compuestos de ocho carbonos con m/z de 349 en la cepa silvestre y en mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  en las condiciones control, daño y micofagia. Las letras en la parte superior de las barras expresan la diferencia entre las condiciones por cepa  $P < 0.05$ .

### 6.8.- La MAPK Tmk3 es necesaria para la expresión de lae1 y del factor de transcripción bZIP 39837, durante daño mecánico y micofagia

Las observaciones en cuando a la producción de metabolitos secundarios de la mutante  $\Delta tmk3$  y el interés que ha generado el comportamiento de esta mutante en otros fenómenos estudiados en este trabajo, no dimos a la tarea de realizar RT-PCR cuantitativos como los que

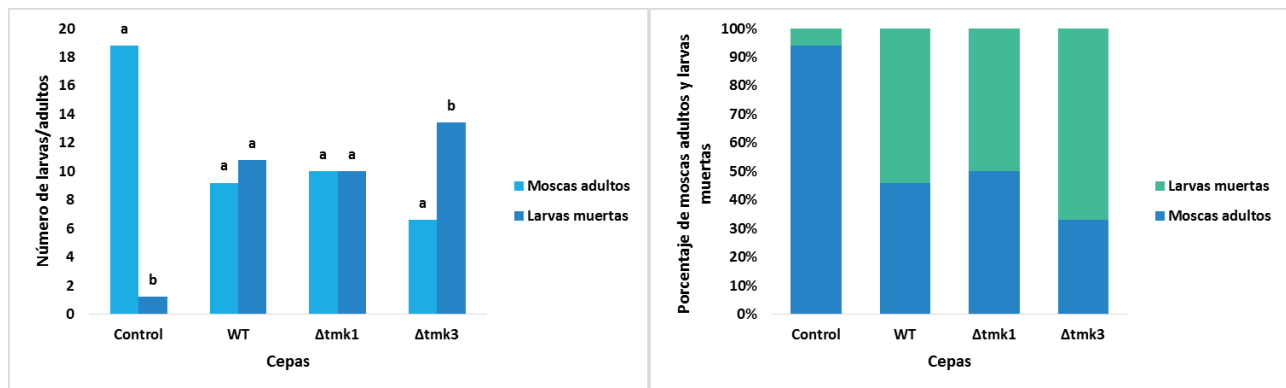
se realizamos para la cepa silvestre. Usando los mismo genes para el análisis, realizamos comparaciones de gen por gen entre la mutante  $\Delta tmk3$  la cepa silvestre. La figura 14 muestra las comparaciones en la expresión de los genes entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk3$  en los diferentes tiempos de las condiciones (daño y micofagia), la figura 14a muestra que la expresión de *lae1* que se dispara a los 30 minutos de daño mecánico y se reduce en este tiempo en micofagia, en la mutante  $\Delta tmk3$  este gen se expresa menos que el control, mientras que en los tiempos posteriores de daño mecánico y micofagia se reduce la expresión en la cepa silvestre y en la mutante sigue sin expresarse (se repite el mismo comportamiento para el gen bZIP 39837). La expresión del gen bZIP 314604 igual a *lae1*, se dispara en los primeros 30 minutos después del daño y en micofagia aunque es poca la expresión también de induce este gen, se mantiene la expresión de este gen hasta una hora y 24 después de micofagia, ya que a este tiempo y tiempo más largos de daño, este gen deja de expresarse (Figura 14b).



**Figura 14.-** Comparación en la expresión de los genes *lae1*, bZIP 314604 y39837 entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk3$ . a) Expresión del gen *lae1*; b) Expresión del gen bZIP314604; c) Expresión del gen bZIP39837. 30'D (30 minutos después del daño); 30'F (30 minutos después de micofagia); 1D (1 hora después de daño), 1F (1 hora después de micofagia); 24D (24 horas después de daño); 24F (24 horas después de micofagia). B31: gen bZIP 314604 B39: gen bZIP 39837.

### 6.9.- La mutante $\Delta tmk3$ es capaz de matar más larvas que la cepa silvestre y que la mutante $\Delta tmk1$

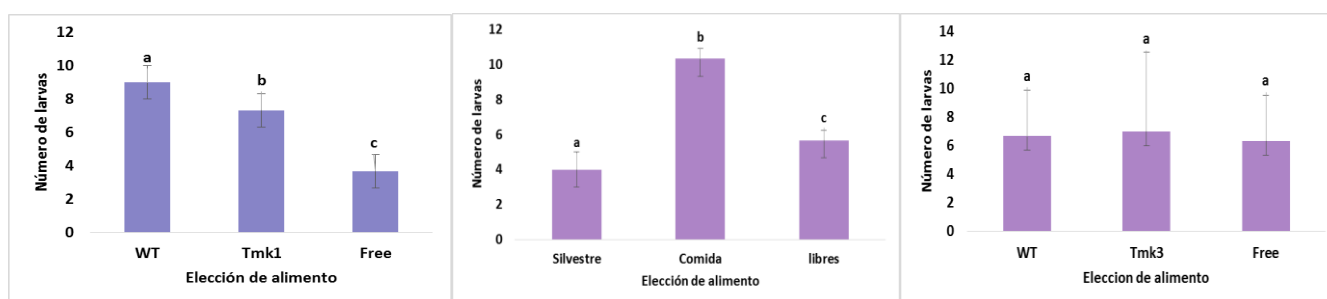
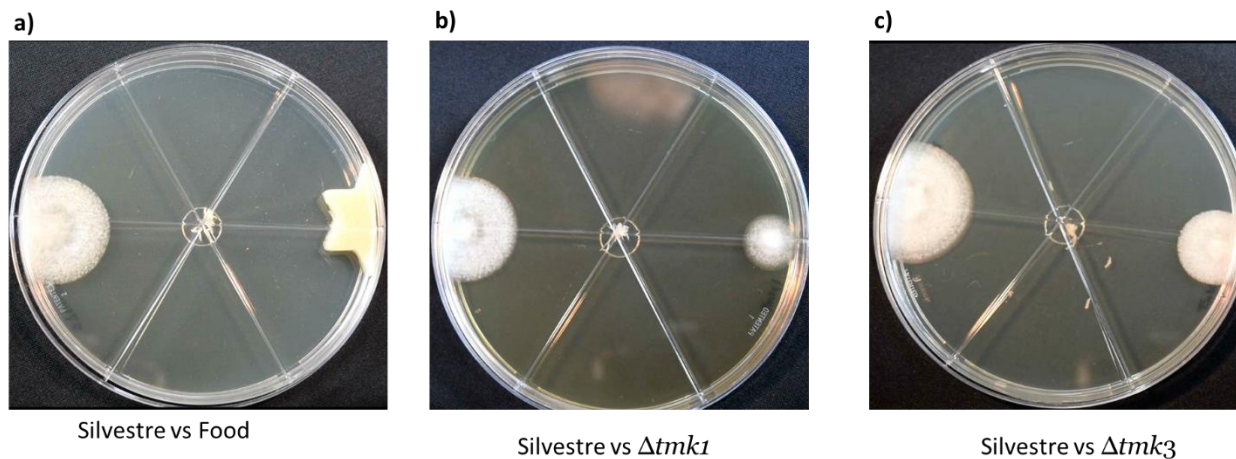
Después de evaluar la respuesta morfológica, metabólica y genética de *T. atroviride* al daño mecánico y a micofagia, nos interesaba saber qué era lo que pasaba con el desarrollo y comportamiento de las larvas de *D. melanogaster* después de las interacciones con la cepa silvestre y las mutantes de MAPK. En observaciones durante la realización de las interacciones notábamos que algunas larvas morían después de 24 horas de interacción con las cepas de *T. atroviride*. Por ello nos dimos a la tarea de analizar este fenómeno en particular, para lo cual llevamos a cabo interacciones en las cuales colectábamos las larvas, cuantificábamos cuáles de ellas estaban muertas y las demás las colocábamos en una caja de Petri independiente hasta que completaran su ciclo de vida a moscas adulto, igualmente cuantificando cuáles de ellas morían durante el transcurso del experimento. La figura 15a muestra la comparación entre las larvas que completaron su ciclo de vida sin morir (moscas adultas) y aquellas que murieron después de la interacción con las diferentes cepas, como se puede observar para el caso de la condición control del número de larvas usadas casi el total se convierten en adultas (más del 90% en la figura 15b), durante las interacciones con *T. atroviride* silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$ , se observa que la cantidad de moscas adulto y larvas muertas es igual (aproximadamente el 50%, 15b), mientras que la mutante  $\Delta tmk3$ , a pesar de ser mayormente depredada por las larvas como se mostró en la figura 9b, es capaz de matar más larvas y por ende baja el número de las larvas que completan su ciclo de vida a adultos.



**Figura 15.-** Efecto de la interacción con *T. atroviride* silvestre y las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  en la supervivencia y ciclo de vida de las larvas de *D. melanogaster*. a) mortalidad y supervivencia expresadas en número de larvas y adultos. b) mortalidad y supervivencia expresadas en porcentaje con respecto al número de larvas usadas por interacción por réplica. El control usado en la realización de las gráficas fueron larvas que nunca tuvieron algún contacto con *T. atroviride*. Los números en la parte superior de las barras de la figura 15a, representan las diferencias entre las condiciones por cepa utilizada.

### **6.10.- Análisis de la elección de alimento (cepas mutantes y silvestres) de larvas de *D. melanogaster***

Después de determinar que las cepas de *T. atroviride* eran capaces de matar a las larvas de *D. melanogaster* y afectar el ciclo de vida de las mismas, quisimos analizar lo que pasaba en ensayos de elección de alimento y que factores podrían estar participando, primero para que las larvas comieran más de una cepa que de las otras (mutante  $\Delta tmk3$ ) y si los compuestos producidos o dejados de producir por las diferentes cepas también participaban en este evento biológico. Para esto llevamos a cabo análisis de elección de alimento (food choice), utilizados ampliamente en los análisis de comportamiento y/o preferencia de larvas o moscas adultas. En nuestro caso cultivamos a las cepas de *T. atroviride* en cajas de Petri como se describió en materiales y métodos, para analizar la preferencia entre una y otra cepa del hongo y, grabamos su comportamiento en videos. La figura 16 muestra las combinaciones analizadas para hacer las elecciones de alimento, mientras que las larvas fueron colocadas en el centro de la caja como se puede observar en las imágenes. Las gráficas en la parte inferior de las imágenes del experimento de “food choice” muestran la preferencia de las larvas hacia algún alimento expresadas en gráficas de barras en las cuales se puede observar que en el primer ensayo las larvas prefieren irse hacia la comida que hacia la cepa silvestre (Figura 16a), en el ensayo de elección entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$  se puede observar que prefieren irse o quedarse en la cepa silvestre que en la mutante (Figura 16b), mientras que para el caso de los ensayos con la mutante  $\Delta tmk3$  se puede observar que no hay diferencias significativas entre cuál cepa prefiere irse o permanecer caminando en el medio de cultivo.

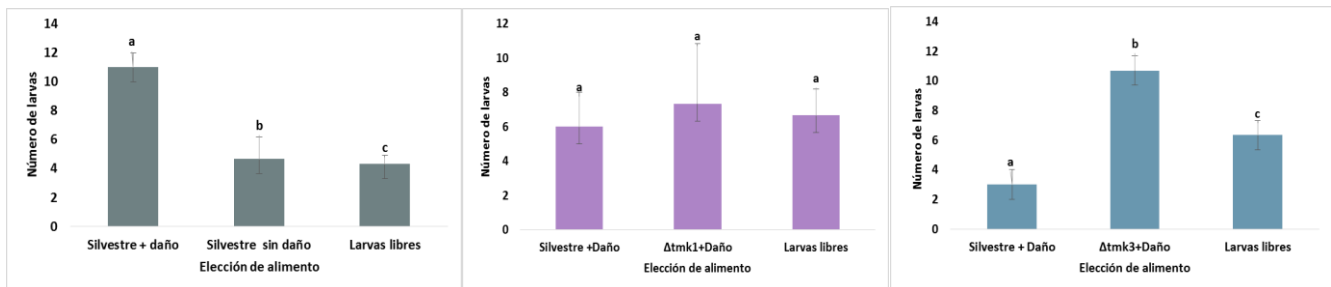
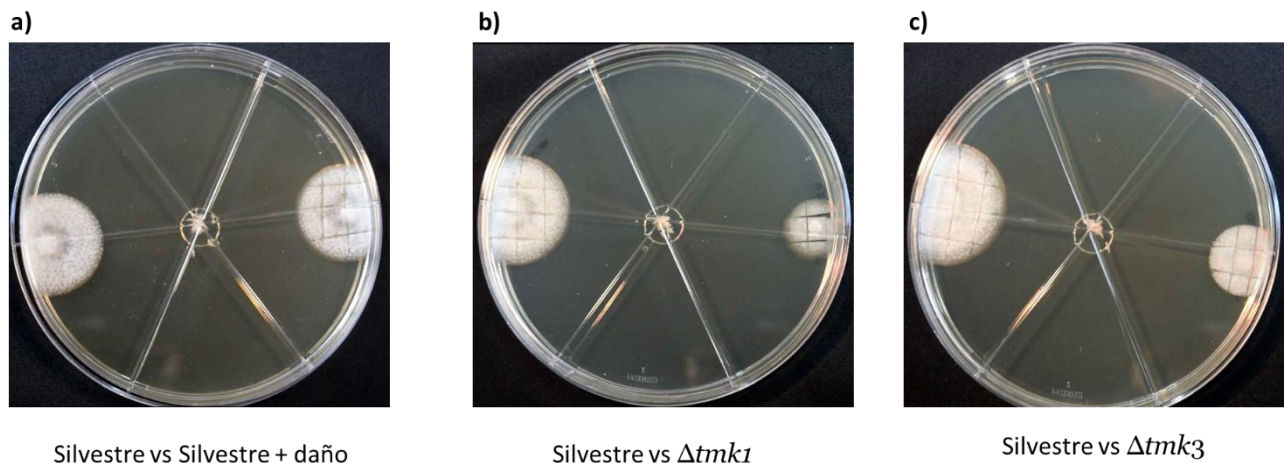


**Figura 16.-** Ensayos de “Food choice” entre la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$ , usando como control la elección entre la cepa silvestre y comida especial para larvas de *D. melanogaster* (a). (b) elección de alimento y su correspondiente análisis entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$  y (c) elección de alimento y su análisis entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk3$ . Las letras en la parte superior de las barras en las gráficas son las diferencias entre cada alimento con respecto a la primer condición  $P < 0.05$ .

Como ya se ha descrito anteriormente al hacerle daño a las cepas de *T. atroviride* cambia la producción de metabolitos secundarios, entonces para saber si al aumentar o disminuir la producción de compuestos en las cepas, podría afectar la elección de alimento de las larvas y poder darle un papel a los metabolitos secundarios de *T. atroviride*, llevamos a cabo los mismos en los experimentos de “food choice” pero haciéndole daño a las colonias para promover cambios en la producción de compuestos. Las combinaciones de cepas así como las condiciones utilizadas fueron las mismas descritas para la figura 16.

La figura 17 muestra los ensayos de “food choice” con las cepas dañadas, utilizamos como control una combinación de la cepa silvestre con y sin daño para analizar el efecto de los metabolitos producidos después del daño mecánico y como se puede observar en la gráfica de la figura 17a, un mayor número de larvas prefieren irse hacia la cepa dañada. Para el caso de la combinación entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$  con daño, no existen diferencias entre el número que prefieran estar en una u otra cepa o permanecer caminando en el medio de

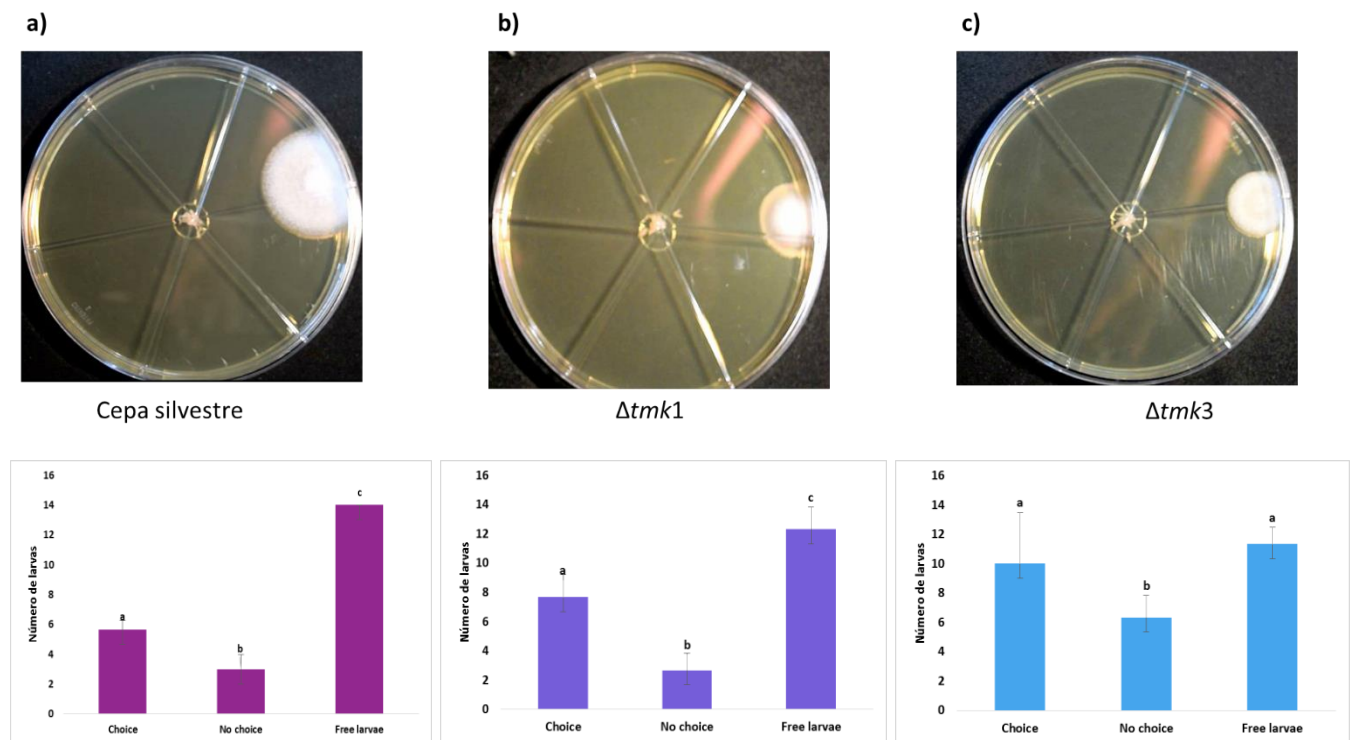
cultivo (figura 17b). La mutante  $\Delta tmk3$  en la que en los experimentos de “food choice” sin daño no parece tener diferencia con la cepa silvestre de acuerdo al número de larvas que prefieren estar en su colonia, en estos “Food choice” en las cuales se le hacía daño a los micelios, un mayor número de larvas prefieren estar en la mutante  $\Delta tmk3$  dañada que en la cepa silvestre dañada o en el medio de cultivo (Figura 17c), esto nos habla de que los compuestos que se producen o dejan de producir en las cepas están involucradas en la preferencia de las larvas de preferir una u otra cepa.



**Figura 17.-** Experimentos de “food choice” de las combinaciones de la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  con daño. a) “Food choice” y su análisis entre la cepa silvestre sin daño y la cepa silvestre con daño. b) “Food choice” y su análisis entre la cepa silvestre con daño y la mutante  $\Delta tmk1$  con daño. c) “Food choice” y su análisis entre la cepa silvestre con daño y la mutante  $\Delta tmk3$  con daño. Las letras en la parte superior de las barras muestran las diferencias entre las elecciones de alimento  $P < 0.005$ .

Algunas de las observaciones hechas durante los ensayos de “Food choice y la preferencia de las larvas, veíamos que algunas de las larvas llegaban, tocaban el hongo y daban vuelta o en otro caso parecía que se veían atraídas hacia las cepas e igualmente daban media vuelta, por eso realizamos ensayos de “No Choice”, en las cuales como mencionamos arriba cuantificamos aquellas que se veían repelidas probablemente por los compuestos producidos por las cepas de *T. atroviride*, igualmente los realizamos con las cepas con y sin daño.

La figura 18 muestra los resultados de los ensayos de “No choice” realizados con cada una de las cepas y su respectivo análisis. Como se puede observar en los tres casos hay un pequeño número de larvas que rehúyen a las cepas, sin embargo para el caso de la mutante  $\Delta tmk3$  (Figura 18c) el número de larvas que huyen de esa cepa mutante es mayor comparado con la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$ . Cabe aclarar que el número de larvas usadas como se describe en materiales y métodos fue de 20. Sin embargo, la suma expresada en las gráficas no coincide, dado que se contaron las larvas que llegaban y daban media vuelta, pero varias de estas larvas regresaron y se mantuvieron sobre el micelio de las cepas.

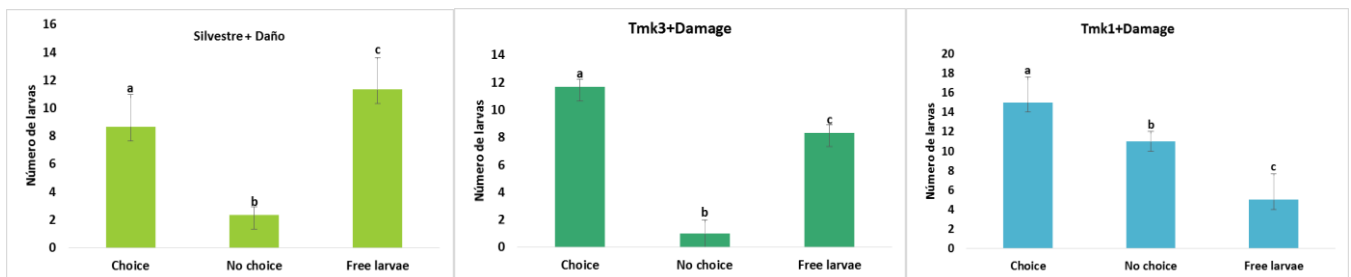
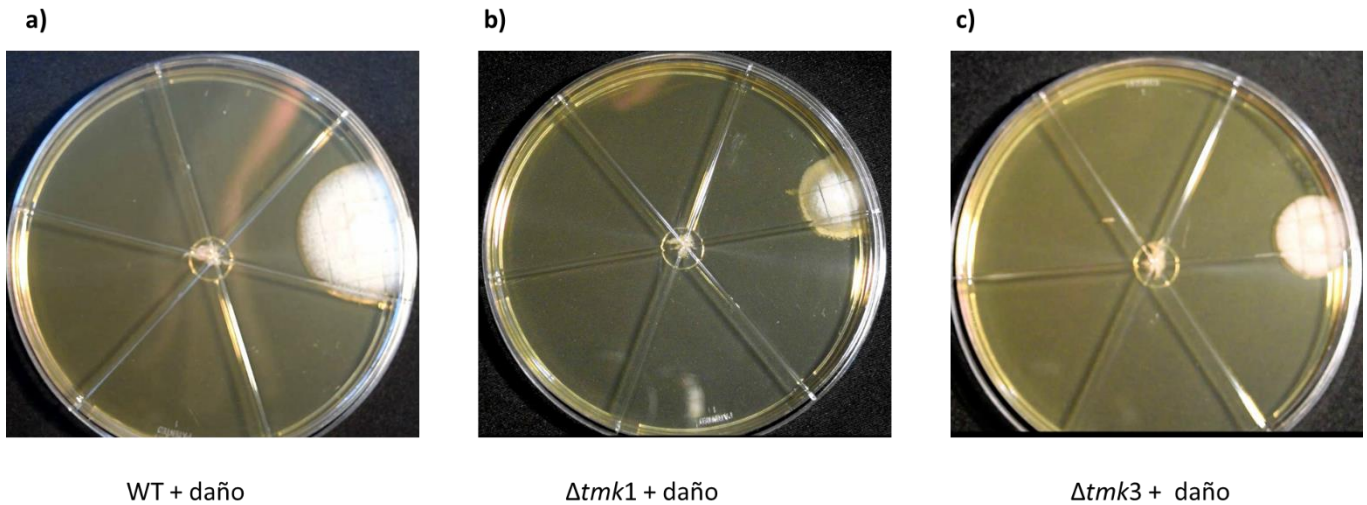


**Figura 18.-** Ensayos de “No choice” de las cepas de *T. atroviride* silvestre y las mutante  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$ , así como sus respectivas cuantificaciones. Las letras en la parte superior de las barras muestran las diferencias entre las elecciones de alimento  $P < 0.005$ .

Los ensayos de “No choice” anteriores los realizamos también con las cepas con daño para analizar la influencia de los compuestos producidos o dejados de producir después de hacerle daño mecánico a los micelios de cada una de las cepas en las larvas de *D. melanogaster*.

Lo que se puede observar en cada una de las imágenes y gráficas de la figura 19 es que, comparado con los “Food choice” realizados con las cepas después de hacerles daño

mecánico, el número de larvas que huye de las cepas es menor, al contrario parecería que se ven más atraídas, ya que el número de larvas que permanece en el micelio es mayor, esto para el caso de la cepa silvestre y de la mutante  $\Delta tmk3$  (Figura 19 a, c), mientras que para la mutante  $\Delta tmk1$  el número de larvas que huyen es mayor comparadas con las larvas en los ensayos con la cepa silvestre y disminuye el número de larvas libres (Figura 19b).



**Figura 19.-** Ensayos de “No choice” de las cepas de *T. atroviride* silvestre y las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  con daño así como sus respectivas cuantificaciones. Las letras en la parte superior de las barras muestran las diferencias entre las elecciones de alimento  $P < 0.005$ .



## 7.- Discusión

Los hongos son un grupo de organismos que al igual que los animales y las plantas están expuestos a diversos factores ambientales que les puede causar condiciones de estrés como puede ser, cambios extremos de temperaturas, luz, radiación ultravioleta, desecación, daño mecánico y depredación. En el caso de la depredación (micofagia) se tiene muy poco conocimiento de su capacidad para responder a ésta y de ser así, como lo hacen, mientras que la respuesta a daño mecánico ha sido estudiada recientemente en *T. atroviride*. Dichos estudios han descrito que después de sufrir daño mecánico *T. atroviride* es capaz de regenerar sus hifas y producir conidios en el área dañada (Hernández-Oñate et al, 2012). Adicionalmente, se determinó que el daño producido genera grandes cambios transcripcionales en tiempos tempranos (Hernández-Onate et al, 2012). Sin embargo las implicaciones biológicas de la respuesta a daño mecánico en *T. atroviride* aún no se han estudiado y se desconoce si esta respuesta y la respuesta a depredación pueden ser diferentes. Para demostrar si *T. atroviride* es capaz de responder a depredación, llevamos a cabo interacciones con larvas de *D. melanogaster* para analizar la respuesta morfológica comparada con la respuesta a daño mecánico, observándose que al igual que el daño mecánico la depredación por larvas induce la producción de conidios, lo que nos indica que las larvas pueden, al igual que el daño mecánico, inducir en *T. atroviride* cambios fisiológicos para la generación de conidios, lo cual podría haberse esperado, dado que las larvas causan daño mecánico. Sin embargo, en este punto estos resultados no nos aportan evidencia suficiente de que la respuesta a daño mecánico y micofagia puedan ser diferentes.

En plantas ha sido ampliamente estudiada la respuesta tanto a daño como a depredación (herbívora) y se sabe que estas son capaces de responder rápidamente al daño producido y activar mecanismos de defensa (Poudel et al., 2016), como la activación de la producción de ciertos metabolitos secundarios que van a permitir defenderse directamente de sus depredadores o indirectamente atrayendo depredadores de sus herbívoros. Se sabe que en la respuesta inducida por herbívora, las plantas pueden activar la vía del ácido jasmónico (JA) y encender genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios que defienden directamente a la planta, por sus efectos tóxicos y/o repelentes hacia los insectos (Axel Mithöfer and Wilhelm Boland, 2012). En hongos, los estudios acerca del papel de los metabolitos

secundarios en la biología de estos continúan siendo muy pobres. A pesar de esto se ha visto que pueden participar en procesos de esporulación y en algunos casos le dan la capacidad a algunos hongos de inhibir el crecimiento de organismos competidores u antagonistas. Además, muchos de los metabolitos secundarios producidos por los hongos se ha visto que tienen toxicidad contra diversos animales. Con base en estos conocimientos, se ha propuesto que uno de los principales papeles de estos compuestos en los hongos, sea la defensa química, como en las plantas, contra sus depredadores (Schoonhoven 2006). Es sabido que *T. atroviride* produce una gran cantidad de metabolitos secundarios, pero se sabe muy poco sobre si tiene un papel importante en los diversos procesos en la biología de *T. atroviride* y mucho menos si pueden participar en su respuesta contra daño mecánico y micofagia. Interesantemente los resultados encontrados y presentados en el presente trabajo muestran que el daño producido ya sea mecánico o por las larvas repercute fuertemente en la producción de compuestos por *T. atroviride*, ya sea por inducción (daño mecánico y micofagia) o represión en algunos casos (micofagia). Un caso de sumo interés es en la producción de la 6-pentil-alfa-pirona, un compuesto que se sabe tiene propiedades antibióticas y antimicóticas, pero que se desconoce su principal papel en la biología de las especies de *Trichoderma*, a pesar de que lo produce en gran cantidad y se ha propuesto que puede funcionar como molécula señal en el suelo y la rizósfera (Hermosa et al., 2014). Interesantemente, en los resultados aquí analizados, en cuanto a la producción de 6PP, observamos que después del daño mecánico aumenta la intensidad de este compuesto y aún más en respuesta a las larvas (Figuras 5 y 6), lo que podría dar indicios del papel de la 6PP como molécula señal en la respuesta a daño, ya sea mecánico o por insectos micófagos y activar vías de respuesta a este estrés.

En estudios realizados por Hernández-Oñate en el 2012, en análisis de transcriptomas de *T. atroviride* en respuesta a daño mecánico se determinó que vías de NADPH oxidasas son importantes para la generación de conidios después del daño mecánico y que algunos factores de transcripción entre ellos algunos bZIP se inducen en los primeros minutos de respuesta y muchos otros genes cambian su expresión en estas condiciones. Tomando como referencia algunos genes seleccionados de los transcriptomas hechos por Hernández-Oñate (2012), realizamos PCR en tiempo real para *lae1*, bZIP 319344 y bZIP 39837 y comparamos la expresión de estos genes a diferentes tiempos de daño mecánico y en micofagia. Los primeros resultados obtenidos indicaron que a los primeros 30 minutos de daño se observa la mayor

respuesta transcriptómica para daño mecánico, ya que los genes seleccionados son altamente inducidos, mientras que para los 30 minutos después de micofagia hay expresión de los genes pero menor a la de daño e incluso el gen bZIP 39837 se reprime en esta condición, lo que nos podría hablar de una respuesta específica para este gen.

En PCR cuantitativos realizados por Caballero-Ortíz en 2013 en *A. nidulans* durante la interacción con larvas de *D. melanogaster* observan una sobreexpresión de genes relacionados con el metabolismo secundario desde la regulación de la transcripción como en genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios. Sin embargo, no toman como referencia la respuesta a daño mecánico y concluyen que las larvas activan la producción de metabolitos secundarios en *A. nidulans* para poder generar una respuesta de defensa y posteriormente resistencia. En nuestro caso al comparar la respuesta a daño mecánico y a micofagia, a pesar de haber analizado un número pequeño de genes, podemos proponer que puede existir una respuesta transcriptómica específica en los primeros treinta minutos (Figura 6, gen bZIP 39837) y que al contrario de lo que pasa en *A. nidulans* parecería que las larvas reducen la expresión de los genes comparado con los niveles de expresión en daño mecánico. Comparando los datos que sugieren una expresión específica en *T. atroviride* a daño mecánico y a micofagia, con datos reportados recientemente por Plaza y colaboradores (2016), en los cuales realiza análisis transcriptómicos del hongo basidiomiceto *Coprinopsis cinerea* en respuesta al nemátodo micófago *Aphelenchus avenae*, a bacterias y a daño mecánico, encontrando que muchos de los genes identificados no son compartidos para los distintos tipos de estrés analizados, y que sugieren que los hongos tiene la capacidad de disparar una respuesta específica a diferentes tipos de estrés como los animales y las plantas.

A pesar de la evidencia existente, el uso limitado de mutantes y especies de hongos para las posibles vías involucradas en la defensa y/o resistencia contra depredadores, sigue habiendo más preguntas de cómo es captada, transducida y regulada la señal para responder a depredación o daño en hongos. Ahondando en este último y con base a lo que se sabe en *T. atroviride* acerca de su respuesta a daño y el papel de las MAPKs (Medina-Castellanos et al., 2014), podemos ver que no se sabe si el daño mecánico genera una respuesta metabólica en *T. atroviride* y, si igualmente estas MAPKs participan en esta regular esta respuesta. En este sentido nuestros resultados de las interacciones con larvas de *D. melanogaster* y las mutantes

$\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  de *T. atroviride* concluimos que estas cepas son incapaces de producir conidios después de la micofagia, lo que nos sugiere que estas vías de transducción de señales están involucradas en la respuesta contra depredadores en *T. atroviride*.

De manera similar, es sabido que en plantas las vías de MAPK están involucradas en la respuesta a daño producido mecánicamente y se propone que existen tres vías específicas para la respuesta a herbívoros (Li et al., 2006) además que se ha visto que activan la vía del ácido jasmónico para potenciar la producción de metabolitos secundarios que la planta utiliza para defenderse de sus depredadores (Geyter et al., 2012). En relación a este tipo de señalización nos llama la atención que la mutante  $\Delta tmk3$  está gravemente afectada en la producción de metabolitos secundarios, ya que los produce en menor intensidad que la cepa silvestre y que algunos iones desaparecen por completo, sin importar la condición, contrario a lo que sucede con la mutante  $\Delta tmk1$ , en la cual parece que aumenta la producción de muchos compuestos como reportan Reithner y colaboradores (2007). Estos resultados nos permiten que la MAPK Tmk1 regula negativamente la producción de metabolitos secundarios, mientras que la Tmk3 los regula positivamente, a pesar de que no existen reportes previos de que Tmk3 tenga algún papel relacionado con el metabolismo secundario en *T. atroviride*. En *A. nidulans* se ha propuesto que las vías relacionadas a las MAPK *mpkA* y *mpkB* participen en la regulación de la producción de metabolitos secundarios en respuesta a larvas de *D. melanogaster* para activar una defensa contra estos, aunque esto aún no ha sido comprobado (Caballero-Ortíz et al., 2013).

Al analizar grupos de compuestos o compuestos específicos producidos durante daño mecánico y micofagia en las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  con respecto a la cepa silvestre observamos que en la producción de 6PP esta disminuida en las mutantes *tmk1* y *tmk3*, en esta última de manera mucho más pronunciada. El patrón de producción de la 6PP en la cepa es de gran intensidad en daño mecánico y mayor aún en micofagia, lo que nos llevó a sugerir, que esta, podría estar participando en la respuesta a daño sin importar quién o que lo causara. Sin embargo, en las mutantes observamos un comportamiento diferente entre las dos condiciones con respecto al control, por ejemplo en la producción después del daño mecánico, para la mutante  $\Delta tmk1$ , no hay cambios en la producción de este compuesto con respecto a su control y en la mutante  $\Delta tmk3$  la producción disminuye con respecto a su control mientras que en

micofagia en las dos mutantes aumenta, entonces podemos suponer que la 6PP participe como un compuesto de defensa, ya que se induce su producción en mayor intensidad en micofagia comparada con el daño mecánico. Aunque sería muy interesante probar mutantes que no produjeran absolutamente nada de 6PP para comprobar esta hipótesis. Sin embargo, no se sabe cuál es la ruta de biosíntesis de este compuesto ni los genes que regulan su producción aunque se ha propuesto que el factor de transcripción *Thcf1* (*T. harzianum*) regule la producción de 6PP ya que en mutantes nulas para este gen no se producen dos compuestos variantes de la 6PP y disminuye su capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos (Rubio et al, 2008), se podría monitorear la expresión de este gen bajo daño mecánico y micofagia con PCR en tiempo real.

Las micotoxinas con actividad insecticida prometen ser unos de los principales actores en la respuesta de los hongos contra insectos micófagos. Se sabe que las aflatoxinas producidas por *Aspergillus* spp. y sus precursores, son tóxicas a un amplio grupo de animales incluyendo insectos, demostrado por interacciones hechas por, Yin y colaboradores (2012), Trienens y Rohlf (2012), en los cuales analizan la mortalidad de microartrópodos (*F. candida*) y de larvas de *D. melanogaster*, después de la interacción con cepas de las especies de *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. nidulans*). Un tipo de compuestos que se ha descrito poseen actividades insecticidas contra algunos artrópodos, conocidos para el género *Trichoderma* son los sesquiterpenos. Al comparar la producción entre la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  observamos que estos compuestos están aumentados en las mutantes bajo las condiciones control comparadas con la cepa silvestre pero es más grande la diferencia en la mutante  $\Delta tmk1$  en donde se produce más. Lo que se esperaba observar era que al hacerle daño mecánico no se produjeran o no cambiara la producción con respecto a su control y que aumentarían la producción al estar en interacción con las larvas de *Drosophila*. Sin embargo, observamos lo contrario, ya que la producción de estos compuestos aumenta en respuesta a daño mecánico y disminuye en respuesta a micofagia, mientras que para otro sesquiterpeno conocido como cicloneodiol hay algo interesante, ya que en las tres cepas parece tener el mismo comportamiento en la condición control y en respuesta a daño, mientras que en respuesta a micofagia se ve aumentado en la mutante *tmk3*, lo que es muy interesante, porque esta cepa no produce muchos iones que la cepa silvestre sí, pero produce más de un compuesto que le podría ayudar para defenderse o resistir a la depredación por las larvas.

Como hemos descrito anteriormente, las cepas mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  están afectadas en la producción de conidios después del daño y después de micofagia y esto probablemente esté relacionado por la alteración en la producción de compuestos de ocho carbonos. Bajo las condiciones control, la mutante  $\Delta tmk1$  produce igual cantidad que la cepa silvestre, y se puede observar que en estas condiciones lo que se produce es una intensidad baja tal vez porque las condiciones de crecimiento son en oscuridad y por lo tanto si estos compuestos participan en conidiación y *T. atroviride* no esporula en oscuridad, tiene sentido que no se produzcan en la condición control. Sin embargo, no se sabe si estos compuestos participan en disparar la condición en respuesta a daño y mucho menos en micofagia. Al analizar su producción bajo estas condiciones entre las dos cepas anteriores resalta que no se producen en respuesta a daño, pero si en respuesta a micofagia. En base a esto último podemos sugerir que estos compuestos sirven para disparar la conidiación en respuesta a micofagia, pero para que se pueda llevar a cabo la respuesta, la señal debe ser transducida por las vías de MAPKs ya que las mutantes *tmk1* y *tmk3* no conidian bajo micofagia.

Tal vez algo de lo más interesante es lo que pasa en la mutante  $\Delta tmk3$ . Se sabe que una de las características de esta mutante es la producción de un reducido número de conidios en condiciones normales (crecimiento en luz constante), comparado con la cepa silvestre y la mutante  $\Delta tmk1$  que sobre-esporula y además es incapaz de producir conidios en respuesta a daño mecánico y en micofagia. Tal vez la razón sea porque esta mutante no produce los compuestos de ocho carbonos que podrían estar relacionados con el disparo a la conidiación. Se ha propuesto que los compuestos C8 tienen receptores específicos en la membrana que transduce la señal para producir conidios por vías de señalización de proteínas G y/o vías de MAPK (Calvo et al., 2002., Nemcovic et al., 2008) y observando que las mutantes  $\Delta tmk1$  y  $\Delta tmk3$  no esporulan bajo ninguno de las condiciones aquí analizadas, podríamos sugerir que no responden por falta de estas vías de transducción y que a su vez estas vías regulan genes relacionados con la producción de estos compuestos C8 que podría ser una vía retroalimentativa. En resumen estos resultados nos permiten proponer que la vía de la Tmk1 participe en la percepción de los compuestos C8, pero no en la producción (ya que esta mutante produce los compuestos C8), mientras que la Tmk3 participe en la producción, pero no en su percepción.

Dentro de los experimentos que se realizan para analizar el papel de los metabolitos secundarios fúngicos en la defensa contra los insectos micófagos, son los de elección de alimento. Después de determinar que las larvas comen más el micelio de la mutante  $\Delta tmk3$ , investigamos si igualmente los compuestos dejados de producir por esta cepa mutante podrían estar involucrados en la repulsión o atracción de las larvas de *D. melanogaster*. Después de analizar los ensayos de elección de alimento realizados, no se observaron grandes diferencias en las combinaciones de la cepa silvestre con las mutantes, por lo que sólo podríamos discutir que en la elección de alimento entre la cepa silvestre y la  $\Delta tmk1$ , las larvas prefieren irse hacia la cepa silvestre y no a la mutante. Como hemos descrito en este trabajo y por los reportes de Reithner y colaboradores (2007), esta mutante parece que produce más metabolitos secundarios que la cepa silvestre. Pero algo que nos interesó es lo que pasaba si alterábamos el metabolismo de las cepas, en nuestro caso con daño mecánico que como ya se ha mencionado causa alteraciones en la producción de diversos compuestos tanto en la cepa silvestre como en las mutantes. Lo que observamos fue muy interesante, ya que para la elección de alimento entre la cepa silvestre sin daño y esta misma cepa con daño, las larvas de *D. melanogaster*, prefieren irse hacia la cepa dañada, lo que es por demás interesante porque los compuestos que aumentan en la cepa silvestre puede que sirvan como compuestos atrayentes. El otro caso que nos llama la atención es que en la elección de alimento entre la cepa silvestre con daño y la mutante  $\Delta tmk3$  con daño, las larvas prefieren irse hacia la mutante  $\Delta tmk3$  dañada que igualmente soporta lo reportado para *A. nivalans* en que las larvas prefieren mutantes con baja producción de metabolitos secundarios y estos resultados sustentan por qué las larvas se comen más a la mutante  $\Delta tmk3$  por la producción de algún compuesto atrayente en mayor cantidad que en la cepa silvestre. Cabe destacar que en análisis de supervivencia de las larvas de *D. melanogaster* notamos que la mutante  $\Delta tmk3$  mata más larvas que la cepa silvestre y que la mutante  $\Delta tmk1$ , probablemente porque esta mutante produce más ciclonerodiol, un compuesto insecticida. Sin embargo, ya que no tenemos otros compuestos insecticidas identificados en esta mutante que pudieran estar causando la muerte de las larvas, tendremos que continuar en la caracterización de este fenómeno por demás interesante por que como es que una cepa que no produce la mayoría de los compuestos producidos por la silvestre, es más depredada que esta última pero mata también en mayor número a las larvas.

Tomando en cuenta todos nuestros resultados, este trabajo pone en evidencia el papel de los metabolitos secundarios en la defensa o resistencia contra los insectos micófagos, de *T. atroviride* en interacción con larvas de *D. melanogaster*. Además, por primera vez proponemos un papel importante para estos compuestos en la respuesta a daño mecánico no reportado anteriormente, comparando con las mutantes analizadas incapaces de responder a este tipo de daño. La información aquí proporcionada también nos da evidencia de que la respuesta metabólica a daño mecánico y a micofagia puede ser específica en *T. atroviride*, tal y como sucede en plantas. Otro punto de interés que cabe destacar, y que es muy poco estudiado, es la regulación del metabolismo secundario en *T. atroviride* y en este trabajo mostramos evidencia de que las vías de MAPKs de Tmk1 y Tmk3 participan en la regulación negativa y positiva respectivamente de la producción de metabolitos secundarios.



## 8.- Conclusiones

- 1.- Los metabolitos secundarios producidos por *T. atroviride* tienen un papel muy importante y diferente en la respuesta a daño mecánico y a micofagia.
- 2.- El daño mecánico del micelio de *T. atroviride* potencia la producción de metabolitos secundarios.
- 3.- Las vías de MAPK Tmk1 y Tmk3 participan en la respuesta morfológica y metabólica a daño mecánico y a micofagia.
- 4.- Las vías de MAPK Tmk1 y Tmk3 participan en la regulación de la producción de metabolitos secundarios.
- 5.- La respuesta transcriptómica para daño mecánico y a micofagia se induce muy temprano (30 minutos después del daño o micofagia)
- 6.- Los análisis de PCR cuantitativos nos proveen evidencia de que los genes *lae1* y el factor de transcripción bZIP 39837, son necesarios para la respuesta metabólica a daño mecánico, sin embargo parece que las larvas reducen la expresión de estos genes, y que por ende se altere o se reduzca la producción de metabolitos secundarios en *T. atroviride* relacionados con su defensa.

## 12.- Referencias

- 1) Arimura, G.-I., Ozawa, R. & Maffei, M. E. Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 3723–3739 (2011).
- 2) Bayram, Ö, Palmer, J., Keller, N., Braus, G. & Bayram, Ö. One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front. Microbiol.* 6, (2015).
- 3) Bayram, Ö. et al. The *Aspergillus nidulans* MAPK Module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 Controls Development and Secondary Metabolism. *PLoS Genetics* 8, (2012).
- 4) Bleuler-Mínez & Butschi. A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites. (2011).
- 5) Borkovich KA, Ebbole DJ. Cellular and molecular biology of filamentous fungi. Washington, DC: ASM Press; 2010.
- 6) Brakhage, A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 21–32 (2013).
- 7) Bok, JW & Keller, NP. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell* (2004).
- 8) Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. & Keller, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 447–59, table of contents (2002).
- 9) Calvo, A. M. & Cary, J. W. Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Front Microbiol* 6, 62 (2015).

- 10) Caruthers, J. M., Kang, I., Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E. & Christianson, D. W. Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. *J. Biol. Chem.* 275, 25533–9 (2000).
- 11) Ortiz, S., Trienens, M. & Rohlfs, M. Induced fungal resistance to insect grazing: reciprocal fitness consequences and fungal gene expression in the *Drosophila-Aspergillus* model system. *PLoS ONE* 8, e74951 (2013).
- 12) Döll, K., Chatterjee, S., Scheu, S., Karlovsky, P. & Rohlfs, M. Fungal metabolic plasticity and sexual development mediate induced resistance to arthropod fungivory. *Proc. Biol. Sci.* 280, 20131219 (2013).
- 13) Fischer, R & Kües, U. Asexual sporulation in mycelial fungi. *Growth* (2006).
- 14) Gloer, J. B. Antiseptan natural products from fungal sclerotia. *Acc. Chem. Res.* 28, 343–350. (1995)
- 15) Geyter, D. N., Gholami, A & Goormachtig, S. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in plant* (2012).
- 16) Hagiwara, D., Suzuki, S., Kamei, K., Gono, T. & Kawamoto, S. The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 73, 138–49 (2014).
- 17) Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56 (2004).
- 18) Heil, M. Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends Plant Sci.* 14, 356–63 (2009).
- 19) Hernández-Oñate, M., Esquivel-Naranjo, E., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A. & Herrera-Estrella, A. An injury-response mechanism conserved across kingdoms

- determines entry of the fungus *T. atroviride* into development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 14918–14923 (2012).
- 20) Hong, S.-Y., Roze, L. & Linz, J. Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. *Toxins*, (2013).
- 21) John Dighton. (2003). *Fungi in Ecosystem Processes*. The United States Of America: Marcel Dekker, Inc.
- 22) Kant; M and Williams M. Plants and arthropods: friends or foes? *The Plant Cell*. 2011
- 23) Karimi Aghcheh, R., Druzhinina, I. S. & Kubicek, C. P. The putative protein methyltransferase LAE1 of *Trichoderma atroviride* is a key regulator of asexual development and mycoparasitism. *PLoS ONE* 8, e67144 (2013).
- 24) Karimi Aghcheh, R. et al. The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression. *PLoS ONE* 9, e112799 (2014).
- 25) Kroll, K, Pätz, V & Kniemeyer, O. Elucidating the fungal stress response by proteomics. *Journal of proteomics* (2014).
- 26) Lippert, H, Iken, K, Volk, C, Köck, M & Rachor, E. Chemical defense against predators in a sub-Arctic fjord. *Journal of experimental* (2004).
- 27) Leonard, Thomas J., and Dick Stanley. Induction of Haploid Fruiting by Mechanical Injury in *Schizophyllum Commune*. *Mycologia* 65.4 809-22. (1973).
- 28) Maffei, M. E., Mithöfer, A. & Boland, W. Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci.* 12, 310–6 (2007).

- 29) May G. S., T. Xue, D. P. Kontoyiannis, and M. C. Gustin. Mitogen activated protein kinases of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* (2005).
- 30) Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles, Edited by Stephen P. Mackessy CRC Press 2009. Pages 325–336 Print ISBN:
- 31) Medina-Castellanos, E., Esquivel-Naranjo, E. U., Heil, M. & Herrera-Estrella, A. Extracellular ATP activates MAPK and ROS signaling during injury response in the fungus *T. atroviride*. *Front Plant Sci* **5**, 659 (2014).
- 32) Mithöfer, A & Boland, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annual review of plant biology (2012).
- 33) Mukherjee, P. K. & Kenerley, C. M. Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a VELVET protein, Vel1. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2345–52 (2010).
- 34) Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M. & Kenerley, C. M. Trichoderma research in the genome era. *Annu Rev Phytopathol* **51**, 105–29 (2013).
- 35) Palmer, JM & Keller, NP. Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Current opinion in microbiology* (2010).
- 36) Plaza, D., Schmieder, S., Lipzen, A., Lindquist, E. & Künzler, M. Identification of a Novel Nematotoxic Protein by Challenging the Model Mushroom *Coprinopsis cinerea* with a Fungivorous Nematode. *G3: Genes| Genomes| Genetics* **6**, 87–98 (2016).
- 37) Poudel, A. N. et al. Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* (2016).

- 38)Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J. & Jansen, M. A. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends in plant science* 12, 98–105 (2007).
- 39)Pucca, M. B. et al. Ts8 scorpion toxin inhibits the Kv4.2 channel and produces nociception in vivo. *Toxicon* 119, 244–252 (2016).
- 40)Reithner, B., Brunner, K., Schuhmacher, R., Peissl, I., Seidl, V., Krska, R., Zeilinger, S., The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet. Biol.* 42, 749–760 (2005).
- 41)Reithner, B. et al. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genet. Biol.* 44, 1123–33 (2007).
- 42)Rodrigues-Pousada, C, Menezes, RA & Pimentel, C. The Yap family and its role in stress response. *Yeast* (2010).
- 43)Rohlf, M., Albert, M., Keller, N. P. & Kempken, F. Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biol. Lett.* 3, 523–5 (2007).
- 44)Rohlf, M., and Obmann, B. Species-specific responses of dew fly larvae to mycotoxins. *Mycotoxin Res.* 25, 103–112. (2009).
- 45)Rohlf, M. Fungal secondary metabolite dynamics in fungus–grazer interactions: novel insights and unanswered questions. *Frontiers in Microbiology* 5, (2015).
- 46)Roze, L. V., Chanda, A., and Linz, J. E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genet. Biol.* 48, 35–48. (2011).

- 47) Rubio, M. B., Hermosa, R., Reino, J. L. L., Collado, I. G. & Monte, E. Thctf1 transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genet. Biol.* 46, 17–27 (2008).
- 48) Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E. & Christianson, D. W. Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13543–8 (2001).
- 49) Ruijter, G. & Visser, J. Carbon repression in *Aspergilli*. *Fems Microbiol Lett* 151, 103–114 (1997).
- 50) Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. & Harper, J. F. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14 Suppl, S401–17 (2002).
- 51) Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J. A. & Dicke, M. 2006 Insect–plant biology. Oxford, UK: Oxford University Press.
- 52) Seo, S., Katou, S., Seto, H., Gomi, K. & Ohashi, Y. The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. *Plant J.* 49, 899–909 (2007).
- 53) Staaden, S., Milcu, A., Rohlf, M. & Scheu, S. Olfactory cues associated with fungal grazing intensity and secondary metabolite pathway modulate Collembola foraging behaviour. *Soil Biology Biochem.* 43, 1411–1416 (2011).
- 54) Schmidhauser, T. J., Lauter, F. R., Russo, V. E. & Yanofsky, C. Cloning, sequence, and photoregulation of al-1, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5064–70 (1990).

- 55)Spiteller, P. Chemical defence strategies of higher fungi. *Chem. Weinheim Der Bergstrasse Ger.* 14, 9100–10 (2008).
- 56)Suto, M. & Tomita, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 305–11 (2001).
- 57)Temme, N. et al. BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol* 13, 704–718 (2012).
- 58)Trienens, M., Keller, N. & Rohlf, M. Fruit, flies and filamentous fungi – experimental analysis of animal–microbe competition using *Drosophila melanogaster* and *Aspergillus* mould as a model system. *Oikos* 119, 1765–1775 (2010).
- 59)Trienens, M. & Rohlf, M. Insect–fungus interference competition. The potential role of global secondary metabolite regulation, pathway-specific mycotoxin expression and formation of oxylipins. *Fungal Ecol.* 5, 191–199 (2012).
- 60)Trienens, M. & Rohlf, M. Experimental evolution of defense against a competitive mold confers reduced sensitivity to fungal toxins but no increased resistance in *Drosophila* larvae. *Bmc Evol Biol* 11, 206 (2011).
- 61)Tsitsigiannis, D. & Keller, N. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol.* 15, 109–18 (2007).
- 62)Tudzynski, B., Hedden, P., Carrera, E. & Gaskin, P. The P450-4 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes ent-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthesis pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3514–22 (2001).
- 63)War, AR, Paulraj, MG, Ahmad, T & Buhroo, AA. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling* (2012).



- 64)Wright, V. F., Casas, E. D., and Harein, P. K. Evaluation of *Penicillium* mycotoxins for activity in stored-product Coleoptera. *Environ. Entomol.* 9, 217–221. (1980).
- 65)Yin, W.-B. B. *et al.* An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Mol. Microbiol.* **83**, 1024–34 (2012)