



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA



LICENCIATURA EN
MICROBIOLOGIA

Implementación de marcadores de selección en *Trichoderma atroviride*

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Microbiología

Presenta

Juana Jazmín Esquivel Méndez

Director

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

C.U., 03 de mayo de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Implementación de marcadores de selección en
Trichoderma atroviride

por

Juana Jazmín Esquivel Méndez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons](#)
[Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0](#)
[Internacional.](#)

Clave RI: CNLIN-227720



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA



LICENCIATURA EN
MICROBIOLOGIA

Implementación de marcadores de selección en *Trichoderma atroviride*

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA

Presenta

Juana Jazmín Esquivel Méndez

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Director

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime
Secretario

Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Vocal

Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez
Vocal

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Vocal

Firma

C.U., 03 de mayo de 2023

DEDICATORIAS

Con principal dedicatoria a mis papás Cladinet Méndez Soria y Ulises Esquivel Naranjo, quienes siempre me han apoyado en todos los aspectos y que sin ellos no habría podido llegar hasta aquí, a mis hermanos Edgar, Lupita y Fati quienes siempre están ahí; a toda mi familia en general por su amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi padre y director de tesis el Dr. Ulises Esquivel Naranjo por siempre alentarme y llevarme por el bonito camino de la ciencia, por siempre confiar en mí, por dejarme ser parte de su equipo de trabajo y brindarme todos los conocimientos adquiridos hasta el día de hoy.

Agradezco a todo el team Trichoderma del Laboratorio de Microbiología Molecular; en especial al M. en C. Salvador Ramírez, por su apoyo en el uso de equipos y algunos experimentos, y a mis compañeros por hacer más amenos los días en el lab.

A mis amigos, gracias por su amistad y apoyo; y a Haydar por creer en mí siempre y apoyarme en todas mis decisiones.

Por último, agradezco a mis asesores de tesis Dra. Bertha Carvajal, Dr. Fidel Landeros, Dr. Antonio Cervantes y Dr. Fausto Arellano por aceptar ser parte de mi comité, por sus observaciones y sugerencias.

ÍNDICE GENERAL

2	INTRODUCCIÓN.....	16
4	Antecedentes	18
4.1	El género <i>Trichoderma</i>	18
4.2	Importancia de <i>Trichoderma</i>	18
4.3	Capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i>	19
4.4	Competencia por nutrientes	20
4.5	Antibiosis.....	20
4.6	Micoparasitismo.....	20
4.7	Inducción del sistema de defensa sistémico en plantas.....	21
4.8	Reproducción de <i>Trichoderma</i>	22
4.9	Transformación genética de <i>T. atroviride</i>	22
4.10	Marcadores de selección para <i>T. atroviride</i>	24
4.11	Nourseotricina.....	25
4.12	Benomilo	26
4.13	Carboxina.....	26
5	Justificación.....	27
6	Hipótesis.....	28
7	Objetivos.....	29
9	Metodología.....	30
9.1	Cepas y condiciones de cultivo	30
9.2	Extracción de ADN genómico (ADNg) – Fenol/Cloroformo	30
9.3	Construcción del plásmido pBC-NTC con resistencia a Nourseotricina ...	31

9.4	Preparación de células de <i>E. coli</i> competentes químicas para transformar por choque térmico.....	34
9.5	Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	34
9.6	Minipreparaciones de ADN.....	35
9.7	Verificación del plásmido construido (pBC-NTC) por restricción.....	35
9.8	Clonación del gen <i>cla4</i> en el plásmido pBC-NTC.....	36
9.8.1	Amplificación del gen <i>cla4</i> por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
9.8.2	Clonación del gen <i>cla4</i> en el plásmido pGEM-T easy	36
9.8.3	Clonación del gen <i>cla4</i> en pBC-NTC	37
9.9	Clonación del gen <i>nik1</i> en el plásmido pBC-NTC.....	37
9.9.1	Amplificación del gen <i>nik1</i> por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
9.9.2	Clonación de <i>nik1</i> en el plásmido pGEM- Teasy	38
9.9.3	Clonación del gen <i>nik1</i> en pBC-NTC	38
9.10	Construcción del plásmido pGEM-tub2 con resistencia a benomilo	39
9.10.1	Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis del gen <i>tub2</i>	39
9.10.2	Mutagénesis dirigida del gen <i>tub2</i>	40
9.10.3	Clonación del gen <i>tub2</i> en el plásmido pGEM-T easy	42
9.10.4	Construcción de otras versiones del gen <i>tub2</i> con resistencia a benomilo	43
9.11	<i>Construcción del plásmido pGEM-sdh con resistencia a carboxina</i>	43
9.11.1	Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis del gen <i>sdh</i>	43
9.11.2	Mutagénesis dirigida del gen <i>sdh</i>	44
9.11.3	Clonación del gen <i>sdh</i> en el plásmido pGEM-T easy.....	46
9.12	Determinación del patrón de restricción para mapear los genes	47
9.13	Diseño de plásmidos	47
9.14	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antifúngicos	
	47	
9.15	Transformación de <i>T. atroviride</i> por el método de Polietilenglicol-CaCl ₂ ..	47

9.16	Prueba de estabilidad.....	48
9.17	Ensayo de segregación del alelo <i>tub2</i> resistente a benomilo	49
9.18	Identificación del plásmido pBC-NTC en <i>T. atroviride</i> por PCR	49
10	Resultados.....	50
10.1	Construcción del plásmido pBC-NTC	50
10.1.1	Linealización y desfosforilación del plásmido pCB1004 y obtención del fragmento NTC	50
10.1.2	Ligación del vector con el fragmento NTC.....	51
10.1.3	Análisis por restricción del plásmido construido (pBC-NTC).....	51
10.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de NTC.....	55
10.3	Transformación de <i>T. atroviride</i> con el plásmido pBC-NTC por el método de PEG-CaCl ₂	55
10.3.1	Estabilidad de transformantes resistentes a NTC	56
10.4	Identificación del plásmido pBC-NTC en <i>T. atroviride</i> por PCR	57
10.5	Construcción del plásmido pBC-NTC con <i>nik1</i>	58
10.5.1	Clonación de <i>nik1</i> en pGEM-T easy	58
10.5.2	Clonación de <i>nik1</i> en pBC-NTC	61
10.6	Construcción del plásmido pBC-NTC con <i>cla4</i>	66
10.6.1	Clonación de <i>cla4</i> en pGEM-T easy	66
10.6.2	Clonación de <i>cla4</i> en pBC-NTC	69
10.7	Construcción del plásmido pGEM-tub2 con resistencia a benomilo	73
10.7.1	Mutagénesis del gen <i>tub2</i>	73
10.7.2	Clonación de tub2c y tub2t en el plásmido pGEM-T easy	74
10.7.3	Tub2c-1p y Tub2c-4s	78
10.8	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de benomilo	79
10.9	Transformación de <i>T. atroviride</i> con pGEM-tub2c.....	80
10.9.1	Estabilidad de transformantes resistentes a benomilo	81
10.10	Ensayo de segregación del alelo <i>tub2</i> resistente a benomilo	82

10.11 Identificación del alelo mutante <i>tub2</i> en transformantes de <i>T. atroviride</i> resistentes a benomilo.....	83
10.12 Construcción del plásmido pGEM-sdh con resistencia a carboxina	84
10.12.1 Mutagénesis sitio dirigida del gen <i>sdh</i>	84
10.13 Clonación de <i>sdh</i> en pGEM-T easy	86
10.13.1 Transformación de <i>T. atroviride</i> con pGEM-sdh	88
11 Discusión.....	89
12 Conclusiones	95
13 REFERENCIAS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Especies de <i>Trichoderma</i> con potencial para su uso como control biológico contra fitopatógenos.....	19
Tabla 2.	Principales marcadores de selección utilizados en <i>Trichoderma spp</i> ...25	
Tabla 3.	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para generar un alelo mutante de <i>tub2</i> resistente a benomilo.	40
Tabla 4.	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para generar un alelo mutante de <i>sdh</i> resistente a benomilo.. ..	44
Tabla 5.	Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC.	53
Tabla 6.	Tamaño de fragmentos esperados del patrón de restricción del plásmido pGEM-T easy-nik1.....	60
Tabla 7.	Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC-nik1.. ..	64
Tabla 8.	Patrón de restricción del plásmido pGEM-T easy-cla4.....	68
Tabla 9.	Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC-cla4.	71
Tabla 10.	Patrón de restricción del plásmido pGEM-tub2c.....	77
Tabla 11.	Patrón de restricción del plásmido pGEM-tub2t.	78
Tabla 12.	Patrón de restricción del plásmido pGEM-sdh.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i>	21
Figura 2.	Pasos básicos del método de transformación por PEG-CaCl ₂	24
Figura 3.	Plásmido pCB-1004.....	33
Figura 4.	Representación gráfica del gen <i>tub2</i>	40
Figura 5.	Estrategia de mutagenesis puntual del gen <i>tub2</i>	42
Figura 6.	Representación gráfica del gen <i>sdh</i>	44
Figura 7.	Estrategia de mutagénesis del gen <i>sdh</i>	46
Figura 8.	El vector pCB1004 sin marcador de selección y el fragmento NTC.	51
Figura 9.	Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC.....	52
Figura 10.	Plásmido pBC-NTC con resistencia a nourseotricina..	54
Figura 11.	Concentración mínima inhibitoria de la nourseotricina.....	55
Figura 12.	Transformantes de <i>T. atroviride</i> resistentes a NTC.....	56
Figura 13.	Identificación del plásmido pBC-NTC.....	58
Figura 14.	Clonación del gen <i>nik1</i> en el plásmido pGEM t-easy.....	59
Figura 15.	Vector de clonación pGEM-T easy con el gen <i>nik1</i>	61
Figura 16.	Restricción con <i>EcoRI</i> del plásmido pBC-NTC-nik1.....	63
Figura 17.	Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC-nik1.....	63
Figura 18.	Plásmido pBC-NTC-nik1.....	65
Figura 19.	Clonación del gen <i>cla4</i>	67
Figura 20.	Patrón de restricción de los plásmidos pGEM-T easy-cla4.	67
Figura 21.	Vector de clonación pGEM-T easy con <i>cla4</i>	69
Figura 22.	Patrón de restricción de pBC-NTC- <i>cla4</i>	70
Figura 23.	Plásmido pBC-NTC- <i>cla4</i>	72
Figura 24.	Generación del alelo del gen <i>tub2</i> con la mutación que confiere resistencia a benomilo.	74
Figura 25.	Clonación del gen <i>tub2c</i>	75
Figura 26.	Plásmido pGEM-tub2c.....	76
Figura 27.	Clonación del gen <i>tub2t</i>	76
Figura 28.	Plásmidos pGEM-tub2c-1p y pGEM-tub2c-4s.....	79
Figura 29.	Concentración mínima inhibitoria de benomilo.....	80
Figura 30.	Transformantes de <i>T. atroviride</i> resistentes a benomilo.....	81
Figura 31.	Prueba de estabilidad de transformantes resistentes a benomilo.....	82

Figura 32.	Análisis de segregación de la resistencia a benomilo.....	83
Figura 33.	Identificación del alelo mutante <i>tub2</i> resistente a benomilo.....	84
Figura 34.	Construcción del alelo del gen <i>sdh</i> resistente a carboxina..	85
Figura 35.	Clonación del gen <i>sdh</i> en el plásmido pGEM-t easy.....	86
Figura 36.	Plásmido pGEM-sdh.....	87
Figura 37.	Homología de las proteínas Tub1 y Tub2 de <i>T. atroviride</i>	92

Resumen

Las especies del género *Trichoderma* son hongos saprofitos de importancia industrial para la producción de enzimas, metabolitos y utilizados ampliamente en la agricultura para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Trichoderma atroviride* tiene su genoma secuenciado y es utilizado como modelo para estudiar su capacidad antagónica, el metabolismo, la morfogénesis y la interacción con plantas. Varias herramientas moleculares han sido establecidas para la manipulación genética de este hongo con el objetivo de estudiar las funciones de sus genes; sin embargo, existen limitados marcadores seleccionables para su transformación genética. En esta investigación se caracterizaron genes que confieren resistencia a nourseotricina, a benomilo y a carboxina.

El gen *nat1* seleccionable con nourseotrcina, se clonó en el plásmido pCB1004. Se estableció la técnica de PCR doble unión para realizar una mutación puntual en el gen *tub2* de *T. atroviride*, cambiando una histidina por una tirosina en la posición 6 de la beta-tubulina. También se realizó un cambio puntual de la histidina por una leucina en la posición 243 de la succinato deshidrogenasa (*sdh*) que confiere resistencia a carboxina, sin embargo, no se incluyó el promotor con el objetivo de que solo las transformantes que integraran el plásmido por recombinación homóloga fueran capaces de crecer en presencia de carboxina; sin embargo, no fue posible obtener transformantes resistentes, indicando que es esencial incluir la región promotora a un marcador seleccionable para su funcionalidad en *T. atroviride*.

La mutación en el gen *tub2* confirió resistencia a benomilo, generando transformantes estables por la integraron del ADN por recombinación homóloga. La caracterización fenotípica indica diferente resistencia al benomilo en micelio y en espora, sugiriendo una función específica de desarrollo del gen *tub2*. El gen *nat1* que codifica para la N-acetil transferasa confirió resistencia a nourseotricina, pero las transformantes fueron inestables cuando se crecen sin selección, perdiendo resistencia y el plásmido en la primera generación de esporas. Se utilizó el vector pBC-NTC para experimentos de complementación de mutantes carentes del gen *Nik1* que codifica una histidina cinasa y el gen *cla4* que codifica una proteína cinasa MAPKKKK, pero no se tuvo éxito. Con el gen *sdh* con resistencia a carboxina no se logró obtener transformantes de *Trichoderma*, probablemente por la ausencia del promotor en la construcción.

En conclusión, se implementó el marcador seleccionable heterólogo *nat1* que funcionó con alta eficiencia de transformación, generando transformantes inestables, y un

marcador seleccionable homólogo *tub2* con baja eficiencia de transformación, pero generando transformantes estables. Los resultados demuestran el potencial uso de estos marcadores de selección para el análisis funcional de genes en *T. atroviride*.

Abstract

The species of the genus *Trichoderma* are saprophytic fungi of industrial importance for the production of enzymes, metabolites and widely used in agriculture for the biological control of phytopathogenic fungi. *Trichoderma atroviride* has a sequenced genome and is used as a model to study its antagonistic capacity, metabolism, morphogenesis, and interaction with plants. Several molecular tools have been established for the genetic manipulation of this fungus in order to study gene function, however, there are limited selectable markers for its genetic transformation. In this research, genes that confer resistance to nourseothricin, benomyl, and carboxin in *T. atroviride* were characterized.

The *nat1* gene selectable with nourseotricin was cloned into the plasmid pCB1004. The double-junction PCR technique was established to perform a point mutation in the *tub2* gene of *T. atroviride*, changing a histidine to a tyrosine at position 6 of beta-tubulin. A specific-point change of the histidine was also made for a leucine at position 243 of the succinate dehydrogenase that confers resistance to carboxin, however, the promoter was not included with the aim that only the transformants that integrated the plasmid by homologous recombination were able to grow in the presence of carboxin, however, it was not possible to obtain resistant transformants, indicating that it is essential to include the promoter region to a selectable marker for its functionality in *T. atroviride*.

The mutation in the *tub2* gene conferred resistance to benomyl, generating stable transformants by integration of DNA by homologous recombination. The phenotypic characterization indicates different resistance to benomyl in mycelium and in spores, suggesting a specific developmental function of the *tub2* gene. The *nat1* gene conferred resistance to nourseothricin, but the transformants were unstable when grown without selection, losing resistance and the plasmid in the first spore generation. The vector was tested for complementation experiments of mutants lacking the *nik1* gene encoding a histidine kinase and *cla4* gene encoding a MAPKKKK protein kinase, but were unsuccessful. The *sdh* gene with resistance to carboxin, it was not possible to obtain *Trichoderma* transformants, probably due to the absence of the promoter in the construction.

In conclusion, the heterologous selectable marker *nat1* was implemented, which worked with high transformation efficiency, but generated unstable transformants, and a homologous selectable marker *tub2* with low transformation efficiency, but generating stable transformants. The results demonstrate the potential use of these selection markers for the

functional analysis of genes related to resistance to nourseothricin and benomyl in *T. atroviride*.

2 INTRODUCCIÓN

Trichoderma es un género de hongos que se distribuye mundialmente y se encuentra comúnmente en el suelo y la rizosfera, actuando como organismos de vida libre. Varias especies de *Trichoderma* son de importancia económica, debido a que son benéficas para sus plantas hospederas al promover el crecimiento de estas, estimulando y aumentando la respuesta inmune, evitando ataques de patógenos y controlando las enfermedades de las plantas (Nogueira-López et al., 2019; Hewedy et al., 2020).

Las especies de *Trichoderma* juegan un papel importante en la inhibición del crecimiento de patógenos gracias a sus diferentes mecanismos de biocontrol como la antibiosis, micoparasitismo, producción de compuestos volátiles y no volátiles, producción de enzimas hidrolíticas y la competencia por nutrientes (Hewedy et al., 2020). Por otro lado, este género también ha sido un buen modelo para estudiar la regeneración de las hifas ocasionado por daño mecánico (Hernández-Oñate et al., 2012) y la esporulación asexual inducida por luz azul (Schmoll et al., 2010).

Debido a su aplicación industrial y la necesidad del estudio de estructura-función génica, existen varios métodos para la manipulación genética de *Trichoderma spp.* como son PEG-CaCl₂ con protoplastos (Gruber et al., 1990), transformación mediada por *Agrobacterium* (Zeilinger 2004) y transformación biobalística (Lorito et al., 1993), siendo la primera ampliamente usada a nivel mundial.

Por otro lado, los marcadores de selección desarrollados para su transformación en este género incluyen el gen *hph* (higromicina fosfotransferasa; resistencia a la higromicina B) (Mach et al., 1994), *nptII* (neomicina fosfotransferasa II, resistencia a la geneticina) (Gruber et al., 2012), *β-tubulina-2* (resistencia a benomilo) (Peterbauer et al., 1992), y el gen *pyr4* (complementa la auxotrofia a uracilo) (Calcáneo-Hernández et al., 2020).

Los métodos disponibles para la ingeniería genética de *Trichoderma* se limitan a un número pequeño de genes marcadores seleccionables. Por lo cual en este proyecto se lleva a cabo el desarrollo de vectores con nuevos marcadores de selección para la especie *T. atroviride* y lograr mejorar el estudio de la biología del hongo.

Se implementaron los marcadores de selección *nat1* que codifica para una N-acetil transferasa y confiere resistencia a la nourseotricina (Zähringer et al., 1993); alelo *tub2* que codifican para beta-tubulina y confiere resistencia a benomilo (Goldman et al., 1993); y el

alelo *sdh* que codifica para la succinato deshidrogenasa y confiere resistencia a carboxina (Nogueira-López et al., 2019).

4 ANTECEDENTES

4.1 El género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* comprende más de 400 especies, cuyo linaje completo es: dominio Eukaryota; Opisthokonta; Reino Fungi; Dikarya; División Ascomycota; Subdivisión Pezizomycotina; Clase Sordariomycetes; Subclase Hypocreomycetidae; Orden Hypocreales; Familia Hypocreaceae (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>). Las especies de este género son de distribución cosmopolita, presentan un crecimiento filamentoso, comúnmente invasivo, con un estilo de vida micoparasítico, que se encuentran en una gran diversidad de ambientes, encontrándose en el suelo asociado a la raíz de las plantas y en material vegetal en descomposición, material fúngico, entre otros sustratos; demostrando así su gran capacidad saprofita y oportunista, así como su adaptabilidad a diferentes ambientes ecológicos. Su eficiencia en el uso de nutrientes y su fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos ha sido objetivo de gran investigación en ciencia básica y aplicada (Druzhinina et al., 2011; Contreras-Cornejo et al., 2016; Ma et al., 2020).

Debido al pleomorfismo presenta dos estados morfológicos y fisiológicos diferentes; un estado sexual (teleomórfico) conocido como *Hypocrea* y un estado asexual (anamórfico) ampliamente conocido como *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011). Por convención internacional, mediante una encuesta, se acordó utilizar el nombre del género asignado al estado anamorfo “*Trichoderma*”.

4.2 Importancia de *Trichoderma*

Una gran variedad especies de *Trichoderma* parasitan y antagonizan de forma eficiente a hongos fitopatógenos de importancia agronómica (Tyśkiewicz et al., 2022). Además, *Trichoderma* induce la resistencia sistémica de las plantas y promueve el crecimiento al mejorar la nutrición vegetal. Por lo tanto, su uso en los sistemas de producción agrícola como agentes de biocontrol ha sido ampliamente documentado (Contreras-Cornejo et al., 2016) (Tabla 1). Las especies más utilizadas y estudiadas son *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* y *T. asperellum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum* y *T. polysporum* (Ma et al., 2020; Tyśkiewicz et al., 2022). También, las especies de *Trichoderma* tiene una gran aplicación en la biotecnología debido a la capacidad de producir antibióticos y enzimas de interés biotecnológico.

Tabla 1. Especies de *Trichoderma* con potencial para su uso como control biológico contra fitopatógenos.

Trichoderma spp.	Fitopatógeno	Cultivo hospedero	Referencia
<i>T. atroviride</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> etc..	<i>Rhizoctonia solani</i>	Cultivo de papa	Papp et al., 2021
<i>T. asperellum</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>T. koningiopsis</i>	<i>Phytophtora capsici</i>	Aguacate	Andrade-Hoyos et al., 2020
<i>T. atroviride</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Tomate, uvas y fresas	Li et al., 2020
<i>T. harzianum</i> , <i>T. gamsii</i> y <i>T. afroharzianum</i>	<i>Pythium irregularare</i>	Cereales	Howell et al., 2003
<i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium spp.</i>	Cereales, fresa, papa	Mironenka et al., 2021
<i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i>	<i>Colletotrichum spp</i>	Chile	Yadav et al., 2021
<i>T. harzianum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Vegetales y plantas ornamentales	Roco & Perez 2001

4.3 Capacidad antagónica de *Trichoderma*

El uso de algunas especies de *Trichoderma* como agente de control biológico es gracias a su desarrollo como antagonista de fitopatógenos basándose en la activación de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos se basan en el micoparasitismo y en la antibiosis mediante la producción de metabolitos con actividad antifúngica, mientras que los indirectos promueven el crecimiento de la planta e inducen los sistemas de defensa contra hongos fitopatógenos, así como también compiten por espacio y nutrientes con otros hongos (Stracquadanio et al., 2020).

4.4 Competencia por nutrientes

La competencia por nutrientes está directamente relacionada con una tasa de crecimiento rápida en diferentes sustratos y la capacidad invasiva que presentan las especies del género *Trichoderma* en sustratos limitados en nutrientes. También se relaciona la producción de sideróforos de hierro que generalmente es limitante en el suelo, limitando la disponibilidad de este micronutriente para el desarrollo de hongos fitopatógenos. Los complejos sideróforo – hierro son igualmente utilizables por las plantas, representándose en mejor crecimiento en los cultivos.

4.5 Antibiosis.

La antibiosis es una interacción antagónica que implica la participación de compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos que son producidos por las cepas del género *Trichoderma* (Benítez et al., 2004). Una gran variedad de cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles (COV) y no volátiles, siendo los más importantes los policétidos y los peptaiboles (Tyśkiewicz et al., 2022). Se han descrito más de 370 metabolitos secundarios con fuertes propiedades antagónicas contra hongos fitopatógenos.

4.6 Micoparasitismo

El micoparasitismo consiste en que un hongo (micoparásito) ataca directamente a otro hongo (presa) con el propósito de obtener todos los nutrientes de su presa. La primera etapa del micoparasitismo, es el reconocimiento a distancia y un crecimiento quimiotrópico hasta entrar en contacto con el hospedero. Al contacto, las hifas del micoparásito se enrollan en las hifas del fitopatógeno, con evidencia clara de degradación en las zonas de interacción y penetración de las hifas de hospedero y un crecimiento intracelular del micoparásito (Guzmán-Guzmán et al., 2019). *Trichoderma* degrada los componentes celulares del hospedero mediante la secreción de enzimas hidrolíticas, como quitinasas, glucanasas y proteasas principalmente. Finalmente, la liberación enzimática de nutrientes simples y difusibles, como las hexosas y aminoácidos, son tomados por absorción en las células del micoparásito e incorporados al metabolismo central para sostener el crecimiento y reproducción asexual (Figura 1).

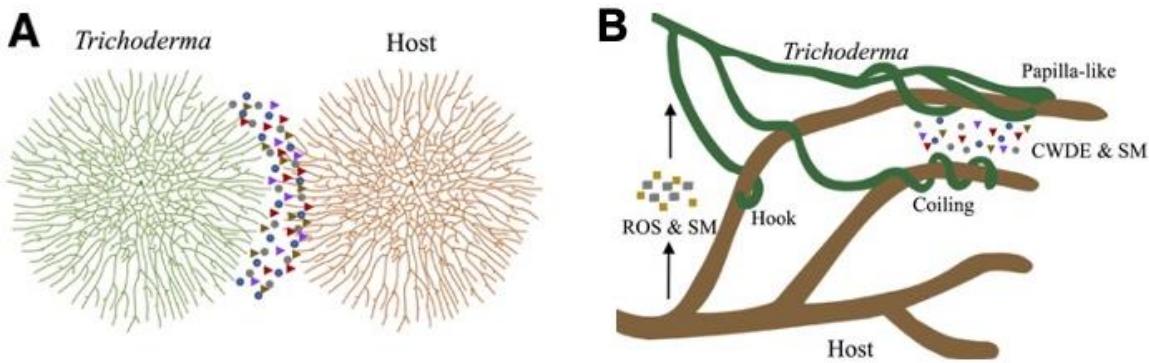


Figura 1. Micoparasitismo de *Trichoderma*. **A.** Pasos iniciales de la interacción entre *Trichoderma* y su presa fúngica. **B.** Principales factores y estructuras utilizados por *Trichoderma* y sus presas durante la interacción. ROS: especies reactivas de oxígeno; CWDE: enzimas degradadoras de la pared celular como proteasas, quitinasa y glucanasas; SM: metabolitos secundarios. Imagen tomada de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>.

4.7 Inducción del sistema de defensa sistémico en plantas

Hasta la fecha se conocen tres tipos de compuestos que inducen resistencia en las plantas y que son producidos por distintas cepas de *Trichoderma*; que son las proteínas con actividad enzimática, homólogos de proteínas codificadas por los genes de avirulencia (*Avr*), y los oligosacáridos que son liberados de las paredes celulares de plantas u hongos debido a la actividad enzimática de *Trichoderma* (Harman et al., 2004).

En las proteínas con actividad enzimática se encuentran las xilanasas que son secretadas por varias especies de *Trichoderma*, estas proteínas inducen las respuestas de defensa de las plantas y la producción de etileno. También se ha reportado que algunas cepas de *T. virens* producen varias proteínas y péptidos que ayudan en la inducción de la biosíntesis de fitoalexina terpenoide (Fuchs et al., 1989).

En los homólogos de *Avr*, los productos proteicos de los genes *Avr* normalmente funcionan como elicidores específicos que pueden llegar a inducir respuestas de hipersensibilidad u otras respuestas relacionadas con la defensa (Baker et al., 1997).

Por último, los oligosacáridos son moléculas que se producen cuando se presentan interacciones entre *Trichoderma*, el patógeno y las raíces de las plantas, jugando un papel

como inductores de la cascada de expresión génica antagónica en *Trichoderma*, sin embargo, también funciona como inductor de mecanismos de defensa en la planta (Zeilinger et al., 1999).

4.8 Reproducción de *Trichoderma*

Las especies de *Trichoderma* se reproducen y dispersan mediante la producción de esporas asexuales (conidios) (Esquivel-Naranjo et al., 2016). El proceso inicia con la formación de hifas aéreas que se diferencian para la formación de conidióforos ramificados y la formación de fiáldes. En la parte apical de las fiáldes se producen los conidios, comúnmente pigmentados con melaninas de color verde y que pueden presentar o no decoraciones (Mendoza-Mendoza et al., 2007). La aplicación de *Trichoderma* en campo para el control biológico es a base de formulaciones de conidios. La producción de conidios (conidiación) se desencadena debido a una serie de factores relacionados al estrés, como la luz, lesión del micelio, disponibilidad de nutrientes y el estado antioxidante (Castellanos et al., 2010).

4.9 Transformación genética de *T. atroviride*

Trichoderma atroviride es usado como un modelo para estudiar la reproducción asexual, la respuesta a la luz y daño, el micoparasitismo, antibiosis y la interacción endófita con las plantas. Por ende, para poder explorar y expandir las aplicaciones biotecnológicas, industriales y agrícolas, se requiere del desarrollo de estrategias genéticas, para realizar sobre expresión o eliminación de genes (Zeilinger 2004; Calcáneo-Hernández et al., 2020).

A lo largo de los años se han descrito una serie de sistemas de transformación para la manipulación genética de hongos filamentosos, iniciando en 1973 con el primer reporte de transformación de *Neurospora crassa*. (Mishra & Tatum, 1973) En *Trichoderma spp.* los principales métodos utilizados para llevar a cabo una transformación con éxito han sido el método clásico de polietilenglicol (PEG)-CaCl₂, (Herrera-Estrella et al., 1990) la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (AMT) (Zeilinger 2004), por métodos físicos como electroporación, ondas de choque y biobalística (Goldman et al., 1990; Lorito et al., 1993; Magaña Ortíz et al., 2013).

El método de transformación de PEG-CaCl₂ se utilizó por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae*, pero años más tarde se aplicó a hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* (Tilburn et al., 1983) y *Neurospora crassa* (Case et al., 1979). Este método es el más utilizado, debido a que es de los más simples y efectivos, y no requiere de equipo especializado. Los pasos básicos de este método son: la preparación de protoplastos, facilitar el ingreso al interior celular del ADN exógeno y finalmente la regeneración de protoplastos.

Los protoplastos se preparan mediante la degradación de la pared celular por digestión enzimática. Las enzimas hidrolíticas utilizadas son una mezcla de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE, Figura 1) de *T. harzianum* (SIGMA). Para la captación de ADN exógeno se utiliza una solución que contiene iones de calcio y estabilizadores osmóticos. Mediante un choque térmico se abren los canales de la membrana plasmática para facilitar la entrada del ADN exógeno a la célula. Los iones calcio al tener una carga positiva juegan un papel importante al recubrir y enmascarar la carga negativa del ADN, para evitar la repulsión por las cabezas de los lípidos que presentan una carga negativa repulsora al ADN; ya una vez dentro, los iones calcio son neutralizados por los fosfatos de la membrana que se encuentran del lado citosólico. Además, el calcio es absorbido más fácilmente por la membrana. Debido a que los protoplastos son sensibles a la presión osmótica, los estabilizadores osmóticos (solución de sorbitol 0.8 a 1.2 M) ayudan a mantener una presión osmótica estable para lograr mantener la integridad de los protoplastos. El PEG es otro componente esencial en este paso debido a que mejora la eficiencia de transformación, promueve la fusión celular, modificando la permeabilidad de la membrana y favoreciendo la entrada del ADN. La regeneración de protoplastos es un proceso clave, donde las células reconstruyen su pared celular y reinician su crecimiento. Por último, únicamente los protoplastos que incorporaron ADN exógeno con un marcador de selección funcional pueden desarrollarse y crecer en un medio de cultivo selectivo (Li et al., 2017) (Figura 2).

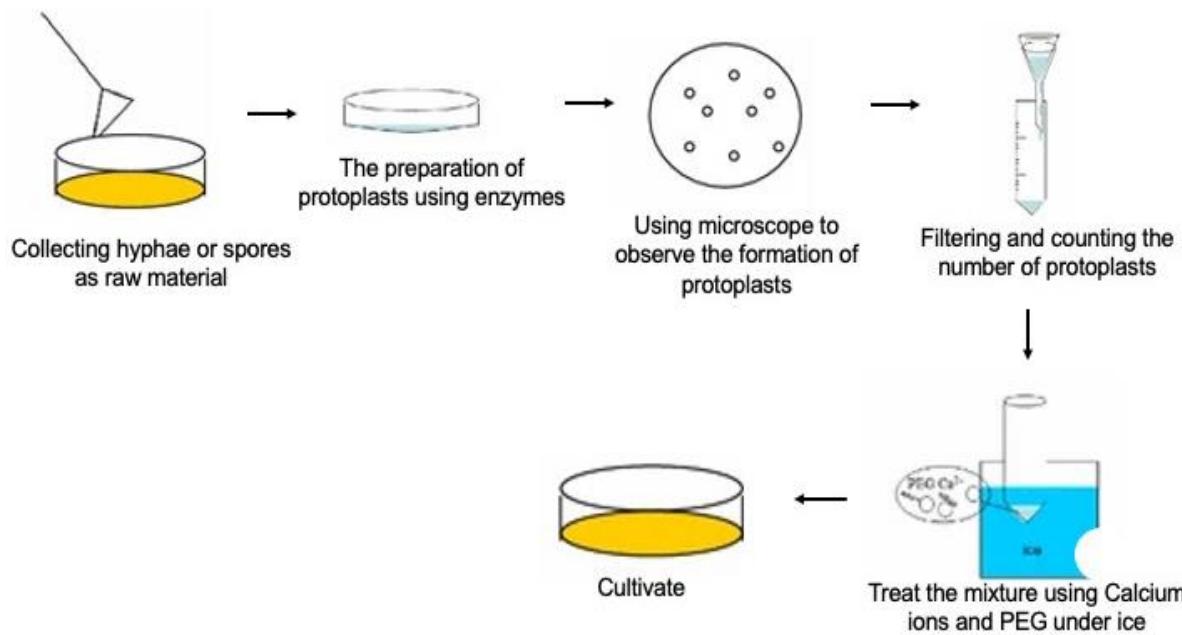


Figura 2. Pasos básicos del método de transformación por PEG- CaCl_2 . Primero se colectan las hifas o las esporas, posteriormente se preparan los protoplastos utilizando enzimas hidrolíticas, con ayuda de un microscopio se va observando la formación de protoplastos. Luego se lleva a cabo el filtrado y conteo de protoplastos, la mezcla se trata con iones de calcio y PEG; por último, se cultivan los protoplastos. Imagen tomada de <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7>.

4.10 Marcadores de selección para *T. atroviride*

Comúnmente, el ADN exógeno es introducido en las células utilizando plásmidos como vectores para transformar un organismo. Las transformantes se cultivan en medios selectivos que permite el crecimiento de las células que incorporaron el vector que porta un marcador de selección. Los marcadores de selección utilizados en hongos son genes que codifican una enzima que inactiva los antibióticos por una transformación química, variantes alélicas insensibles a los antibióticos y genes del metabolismo central que complementan una auxotrofia.

Se han desarrollado una serie de marcadores de selección para la transformación de *Trichoderma spp.* (Tabla 2), tanto marcadores auxotróficos los cuales requieren de una cepa parental mutante con una afectación en una vía biosintética para un metabolito esencial;

como marcadores de resistencia a fármacos, estos tienen una ventaja al no requerir de una cepa parental específica (Gruber et al., 2012; Nogueira-López et al., 2019). Estos últimos codifican enzimas que inactivan el fármaco por modificación covalente o representan una variante alélica que ha sufrido una mutación en el sitio de interacción del fármaco.

Tabla 2. Principales marcadores de selección utilizados en *Trichoderma spp.*

Marcador	Proteína	Resistencia	Referencia
<i>hph</i>	Higromicina fosfotransferasa	Higromicina B	Mach et al 1994.
β -tub	β -tubulina	Benomilo	Goldman et al., 1993
<i>nptII</i>	Neomicina fosfotransferasa II	Geneticina	Gruber et al., 2012
<i>sdh</i>	Succinato deshidrogenasa	Carboxina	Nogueira-López et al., 2019
<i>amdS</i>	Acetamidasa	Acetamida	Penttilä et al., 1987
<i>arg2</i>	Carbamoil fosfato sintetasa	Auxotrofia a arginina	Baek & Kenerley 1998
<i>Pyr4</i>	OMP decarboxylase	Auxotrofia a uracilo	Calcaneo-Hernández et al., 2020.

4.11 Nourseotricina

La nourseotricina (NTC) es un metabolito producido por la bacteria *Streptomyces noursei*, pertenece a la clase de antibióticos de estreptotricina que inhiben la síntesis de proteínas (Yang et al., 2019). Este antibiótico es utilizado para la selección en una amplia gama de microorganismos como en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; y en bacterias como *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis*, entre otros. La resistencia al NTC se da gracias a una N-acetyltransferasa (NAT) codificada por el gen *nat1* de *S. noursei* (Lehman et al., 2016). NAT inactiva al NTC al acetilar el grupo beta-amino del residuo betalisin del NTC (Kochupurakkal & Iglesias (2013).

4.12 Benomilo

El benomilo (metil 1-(butilcarbamoyl)-2-bencimidazolcarbamato) ha sido utilizado como fungicida desde hace más de 20 años. Este antifúngico actúa evitando la polimerización de la beta-tubulina y la formación de microtúbulos. La resistencia al benomilo se da mediante una mutación en la proteína β -tubulina que interfiere en la unión del fungicida a la proteína. El benomilo ya ha sido utilizado como marcador de selección en *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Septoria nodorum*, *Neurospora crassa*, *Acremonium chrysogenum*, *Septoria nodorum*, entre otros (Goldman et al., 1993; Mukherjee et al., 2003).

4.13 Carboxina

La carboxina (5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatiina-3-carboxanilida) es un fungicida sistémico, actúa sobre la cadena respiratoria mitocondrial principalmente sobre el sistema Succinato-Coenzima Q oxidoreductasa del complejo II. Este fungicida es utilizado en la agricultura aplicándose a las semillas antes de la siembra, para evitar el crecimiento de hongos que causan enfermedades en la semilla y la plántula (Huang et al., 2022). La carboxina es un inhibidor específico de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), durante la respiración aeróbica la SDH se encarga de catalizar la transferencia de electrones desde el succinato a la quinona. La carboxina al unirse a la enzima SDH evita la transferencia de electrones, inhibiendo el desarrollo del organismo, sin embargo, una mutación directa en el gen *sdh* le confiere resistencia a la carboxina (Nogueira-López et al., 2019) como ya se ha descrito en modelos fúngicos como son *Ustilago maydis* (Broomfield & Hargreaves, 1992), *Aspergillus oryzae* (Shima et al., 2009) y *Coprinopsis cinerea* (Kilaru et al., 2009).

5 JUSTIFICACIÓN

Actualmente el marcador de selección más usado para la transformación genética de *Trichoderma spp.* es el gen de resistencia a higromicina B; sin embargo, para generar dobles mutantes o para complementar mutantes generadas con resistencia a higromicina B se requiere de la implementación de otros marcadores con resistencia a antibióticos.

6 HIPÓTESIS

La generación de vectores con nuevos marcadores de selección para *T. atroviride* mejora el estudio de la biología de *Trichoderma*, logrando la eliminación de varios genes simultáneamente, la localización simultánea de varias proteínas y la complementación homóloga o heteróloga de cepas mutantes.

7 OBJETIVOS

1.1. General

Implementar nuevos marcadores de selección en *T. atroviride* para la eliminación, complementación y la expresión de genes.

1.2. Particulares

- 1.2.1.**Diseñar y construir un plásmido que porte el gen *nat1* que confiere resistencia a la nourseotricina
- 1.2.2.**Diseñar y generar una variante alélica del gen *tub2* que confiera resistencia a benomilo.
- 1.2.3.**Diseñar y generar una variante alélica del gen *sdh* que confiera resistencia carboxina.
- 1.2.4.**Demostrar que el gen *nat1*, *tub2* y *sdh* confieren resistencia a nourseotricina, benomilo y carboxina, respectivamente, en *Trichoderma atroviride*.

9 METODOLOGÍA

9.1 Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa silvestre (WT) de *T. atroviride* (IMI206040) para la transformación genética. Las cepas se propagaron en medio de cultivo Agar Papa-Dextrosa (PDA) a 27°C en una cámara equipada con lámparas de luz blanca. Para la extracción de ADN las cepas se cultivaron en Caldo Papa-Dextrosa (PDB) a 27°C con agitación orbital (150 rpm) durante 72 horas. La cepa DH5 α de *Escherichia coli* fue crecida en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido o sólido a 37°C durante 16 h, en caso del medio líquido se incubó con agitación orbital (150 rpm). Dependiendo del plásmido, los transformantes de *E. coli* fueron seleccionados en LB suplementado con 50 µg/mL de cloranfenicol o ampicilina. Todos los medios de cultivo utilizados fueron previamente esterilizados en una autoclave a 15 Lb de presión y 121°C durante 15 minutos. Para el caso de los medios selectivos, el antibiótico fue agregado después de esterilizarlos y dejarlos enfriar. Los medios de cultivo y cepas fueron manipuladas en una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad.

9.2 Extracción de ADN genómico (ADNg) – Fenol/Cloroformo

Para obtener y purificar el ADNg de *T. atroviride*, el medio de cultivo PDB se inoculó con 1×10^6 conidios por mL y se incubó 48 h a 27°C en agitación. El micelio se filtró a través de conos de magitel y congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente, se colocó en un mortero con nitrógeno líquido (N_2) para ser pulverizado con ayuda de un pistilo hasta obtener un polvo fino blanco, se colocaron 500 µL del polvo en microtubos de 1.5 mL fríos. Los tubos se incubaron en hielo y se les agregaron 600 µL de buffer de urea (7 M Urea, 0.35 M NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA y 1 % de N-Lauril Sarcosina) a cada uno. Los tubos fueron mezclados durante 2 min en vórtex y se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente. Después se les adicionaron 600 µL de Fenol (50%)- Cloroformo (48%)- Alcohol Isoamílico (2%), los tubos fueron mezclados en vórtex durante 10 min y centrifugados a 10,000 rpm por 10 min. La fase acuosa con los ácidos nucleicos fue recuperada y colocada en un microtubo nuevo, repitiendo nuevamente los pasos anteriores a partir de la adición de la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Para la precipitación del ADN, se agregó 1 volumen de isopropanol por cada volumen del sobrenadante recuperado, se mezcló por inversión hasta

observarse la formación de hebras blancas que comprende principalmente el ADNg insoluble. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos, se observó la formación de pastilla en el fondo del tubo y se desechó el sobrenadante. Las pastillas se lavaron para eliminar sales agregando 500 µL de etanol al 70% y se mezclaron en vórtex para ser nuevamente centrifugados a 12,000 rpm por 10 min y desecharlo el sobrenadante. Se dejaron secar los tubos abiertos bocabajo sobre una hoja de papel absorbente, y la pastilla se disolvió en 100 µL de agua grado HPLC con ayuda de un vórtex. Por último, se les agregó 1 µL de RNAsa (10 µg/ml) (Invitrogen) a cada tubo y se incubaron a 37°C durante 20 min.

La cuantificación del ADNg se realizó mediante un Nanodrop; y la integridad del ADNg se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. La muestra de ADN fue teñida con bromuro de etidio (10 µg/ml) y se visualizó en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.3 Construcción del plásmido pBC-NTC con resistencia a Nourseotricina

El gen *hph* que codifica para el gen de resistencia a higromicina B se eliminó del plásmido pCB1004 por restricción con la enzima *HpaI* (Thermo Scientific™) que flanquea el marcador *hph* (Figura 3). Para evitar la autoligación del vector vacío al momento de realizar la ligación, se desfosforiló usando la enzima fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo Scientific™), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

El fragmento NTC comprende el gen *nat1* que codifica la nourseotricina acetil transferasa bajo el control del promotor del gen *gpd* de *Aspergillus nidulans*, este gen confiere resistencia a Nourseotricina en *Metarhizium* y fue obtenido del plásmido pPK2-NTC amablemente proporcionado por el Dr. Israel Enrique Padilla Guerrero de la Universidad de Guanajuato (Padilla-Guerrero y Bidochka, 2017). NTC se clonó en el plásmido pGEM-T easy, obteniendo el plásmido pGEM-NTC, previamente construido en el Laboratorio de Microbiología Molecular. El marcador NTC se recuperó de pGEM-NTC por restricción con la enzima *EcoRI* (Thermo Scientific™), los fragmentos se resolvieron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y la banda correspondiente al fragmento NTC de 1.4 kb, se cortó y se purificó usando columnas de purificación del QIAquick PCR Purification Kit de (QIAGEN).

Los extremos cohesivos del marcador NTC se emparejaron usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* (Thermo Scientific™), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Finalmente, el marcador NTC se ligó en el plásmido pBC1004, previamente linealizado con *HpaI*, para reemplazar el marcador de selección *hph* por el marcador NTC, usando la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific™); siguiendo las recomendaciones del proveedor. El plásmido con NTC se identificó determinando el patrón de restricción y se nombró pBC-NTC.

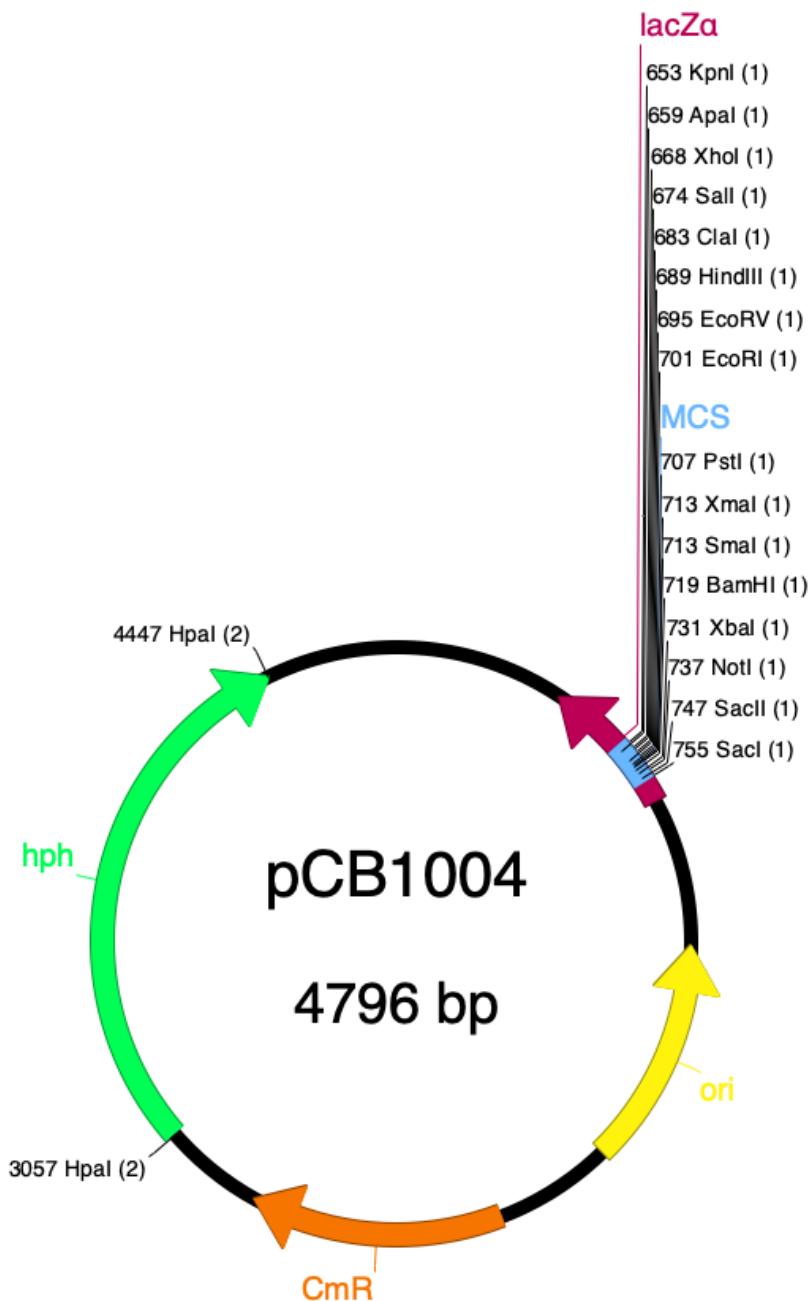


Figura 3. Plásmido pCB-1004. Este plásmido es usado como un vector integrativo en hongos. Este contiene el gen *hph* que codifica la higromicina fosfotransferasa, enzima que fosforila e inactiva la higromicina B. CmR, gen de resistencia a cloranfenicol; ori origen de replicación; MCS, sitio múltiple de clonación; LacZ, gen que codifica para la β-galactosidasa. Plásmido diseñado en el programa ApE- A plasmid Editor v3.0.9.

9.4 Preparación de células de *E. coli* competentes químicas para transformar por choque térmico

Para la producción de células competentes utilizadas para propagación de plásmidos, una colonia de la cepa DH5α de *E. coli* se picó con un palillo estéril, se inoculó en 3 mL de medio LB y se incubó toda la noche a 37°C con agitación orbital constante (160 rpm). El precultivo se vertió en un matraz con 100 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0.3 – 0.6. Una vez alcanzada la densidad de células requeridas, se colocó el matraz en hielo y se repartieron los 100 mL de cultivo en 2 tubos cónicos de 50 mL, manteniéndose incubados en hielo durante 30 min. Posteriormente las células se concentraron centrifugándose a 1990 rcf a 4 °C por 10 min. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en frío con 1.5 mL de medio 2X YT-CC (NaCl 5 g/L, PEG₄₀₀₀, glicerol 100%, MgCl₂ 1M, pH 7.0) frío y se dejaron en hielo durante 10 min. Por último, se realizaron alícuotas de 50 µL en microtubos colocándose inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C. Todos los materiales usados fueron previamente colocados a -20°C.

9.5 Transformación de *E. coli* por choque térmico

La transformación con la ligación pBC-NTC se llevó a cabo en la bacteria *E. coli* DH5α por choque térmico. En un microtubo se mezcló 10 µL de la ligación con 40 µL de KCM (100 mM KCl, 30 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂) y se le adicionó gentilmente a un vial de 50 µL de células competentes, para luego dejar incubando en hielo durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se incubó a 42°C por 2 min e inmediatamente después se colocó en hielo durante 2 min. La transformación se recuperó, adicionando 500 µL de medio de cultivo LB líquido, mezclando 3 veces con la micropipeta e incubando en agitación durante 1 h. Por último, las transformantes se sembraron por dispersión en un medio sólido selectivo, conteniendo LB-cloranfenicol (50 µg/mL), adicionado con 40 µg/mL de IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), un inductor del operón lac que nos permite seleccionar colonias blancas, y 40 µg/mL del cromóforo X-Gal. Los cultivos se incubaron 16-20 h a 37°C. Al control se le agregó H₂O grado HPLC en lugar del inserto (fragmento NTC) al mismo plásmido linealizado y desfosforilado.

Pasado el tiempo de incubación, con un palillo estéril se picaron colonias blancas y se colocaron en 3 mL de medio LB líquido suplementado con cloranfenicol (50 µg/mL), y se incubaron en agitación orbital constante durante 16 h para su posterior análisis.

9.6 Minipreparaciones de ADN

La extracción de plásmidos se realizó por el método de lisis alcalina. Minipreparaciones de ADN plasmídico se obtuvieron de colonias que se picaron con palillos de madera, se inocularon en 3 mL de LB con cloranfenicol o ampicilina y se incubaron a 37°C por 16 h. 1.5 mL de los cultivos bacterianos se colocaron en microtubos 1.5 mL y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min para empastillar las células. El sobrenadante se descartó y la pastilla bacteriana se resuspendió en 100 µL de solución P1 (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, RNAsa 0.1 µg/mL), mezclando en vórtex. Después se agregaron 150 µL de solución P2 (SDS 10%, NaOH 10N, H₂O), se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo por 5 min. Posteriormente se agregaron 200 µL de solución P3 (Acetato de potasio pH 5.5), se mezcló por inversión y se incubó nuevamente en hielo por 5 min. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13,000 rpm durante 15 min, recuperando el sobrenadante en un microtubo nuevo de 1.5 mL y se repitieron nuevamente los pasos de centrifugación y recuperación del sobrenadante. Al sobrenadante se le agregaron 2 µL de RNAsa (Thermo Scientific™) y se incubó 15 minutos a 37°C. El ADN se precipitó agregando 800 µL de etanol absoluto y se incubó a -20°C por 30 min. Al término, las preparaciones se centrifugaron a 13,500 rpm durante 15 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 200 µL de etanol al 70%, centrifugándose nuevamente a 13,000 rpm por 5 min. Por último, se descartó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla colocando los tubos abiertos bocabajo sobre una hoja de papel absorbente y el ADN se disolvió en 80 µL de H₂O grado HPLC.

9.7 Verificación del plásmido construido (pBC-NTC) por restricción

El plásmido se identificó determinando el patrón de restricción con las endonucleasas *KpnI*, *Sall*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *SacI*, *SacII*, *XbaI* y *Xhol* (Thermo Scientific™), siguiendo las condiciones de reacción establecidas por el proveedor.

Los patrones de los fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y fueron teñidas con bromuro de etidio (10 µg/ml) y se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.8 Clonación del gen *cla4* en el plásmido pBC-NTC

9.8.1 Amplificación del gen *cla4* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El gen *cla4* fue amplificado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos N5cla4-F (5'-GTCGCCAGTGGTACTGC-3') y N3cla4-R (5'-GTC CGT CCC CTA CGC CTG -3') que amplifican una banda de 5460 pb. Se utilizó la enzima DreamTaq DNA Polymerasa (Thermo Scientific™) y se realizó la mezcla de reacción de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Las condiciones del termociclador fueron: 3 min a 95°C, 40 ciclos comprendiendo tres pasos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 6.5 min a 72°C. Por último, las reacciones de PCR finalizaron a 72°C por 5 min. El amplicón se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.8.2 Clonación del gen *cla4* en el plásmido pGEM-T easy

Con el objetivo de clonar el gen *cla4* en el vector pGEM-T easy (Promega), se realizó una ligación del gen con el vector, siguiendo las indicaciones de reacción del proveedor y utilizando la enzima T4 DNA Ligasa del kit. La ligación se incubó a 4°C toda la noche. Utilizando 5 µL de la ligación se transformaron células de *E. coli* DH5α mediante el protocolo de transformación por choque térmico y se seleccionaron transformantes en medio LB-ampicilina (50 µg/mL) adicionado con IPTG/X-Gal para seleccionar colonias blancas. De las colonias blancas se trajeron los plásmidos mediante el protocolo de minipreparaciones de ADN por lisis alcalina y los plásmidos que portaban el gen *cla4* se identificaron por restricción, primera aproximación con *EcoRI* (Thermo Scientific™). A los plásmidos positivos, se determinó el patrón de restricción utilizando las endonucleasas *PstI*, *Sall* y *HindIII* y *EcoRI* (Thermo Scientific™). Los fragmentos de las restricciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.8.3 Clonación del gen *cla4* en pBC-NTC

Una vez identificado los plásmidos de interés, se cortaron los plásmidos pGEM-*cla4* y pBC-NTC con la enzima de restricción *EcoRI* (Thermo Scientific™). Para evitar la autoligación del vector vacío al momento de realizar la ligación, se desfosforiló usando la enzima fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo ScientificTM), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Los fragmentos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, las bandas de interés se cortaron con un bisturí y se purificaron siguiendo el protocolo de las columnas de purificación del QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

El gen *cla4* purificado fue clonado en el plásmido pBC-NTC, utilizando la ligasa T4 (Thermo Scientific™) y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Con 5 µL de la ligación, se transformó *E. coli* por choque térmico. Las transformantes se seleccionaron en LB-cloranfenicol (50 µg/ml) adicionado con IPTG/X-Gal. De las colonias blancas se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico. El plásmido se identificó nuevamente por restricción con la enzima *EcoRI* (Thermo Scientific™). Finalmente, la integridad de la secuencia de nucleótidos del gen *cla4* se analizó determinando el patrón de restricción con las endonucleasas *EcoRI*, *EcoRV*, *Clal*, *HindIII*, *SacI*, *SacII*, *Sall* y *Xhol*. Los fragmentos de la restricción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.9 Clonación del gen *nik1* en el plásmido pBC-NTC

9.9.1 Amplificación del gen *nik1* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar el gen *nik1* se utilizaron los oligonucleótidos cOs1-F (TCTAGATGTGCGAGTTAGTAGCCTC) y cOs1-R (TCTAGAGCAGAGGAGTATCGGC) que amplifican una banda de 6.3 kb. Para facilitar la clonación del gen *nik1* en el plásmido pBC-NTC, se adicionaron sitios de restricción *XbaI* en los extremos 5' de los oligonucleótidos (nucleótidos subrayados). La amplificación se realizó utilizando la enzima DreamTaq DNA

Polymerasa (Thermo ScientificTM). La mezcla de reacción se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor y las condiciones del termociclador fueron: 3 min a 95°C, 40 ciclos comprendiendo tres pasos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 6.5 min a 72°C. Por último, las reacciones de PCR finalizaron a 72°C por 5 min. El amplicón se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y el fragmento se purificó por columnas de purificación del QIAquick PCR purification Kit de QIAGEN.

9.9.2 Clonación de *nik1* en el plásmido pGEM- Teasy

El gen *nik1* se clonó primero en el vector pGEM-Teasy (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, se transformó *E. coli* por choque térmico y se seleccionaron las colonias transformantes mediante LB-ampicilina (50 µg/ml) adicionado con IPTG/X-Gal. Se picaron 5 colonias blancas y se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se identificaron por restricción con *EcoRI* (Thermo ScientificTM). Finalmente, la identidad de la secuencia de nucleótidos del gen *nik1* se analizó determinando el patrón de restricción con las endonucleasas *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *PstI*, *SacI*, *Xhol* y *XbaI* (Thermo ScientificTM). Los fragmentos de la restricción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.9.3 Clonación del gen *nik1* en pBC-NTC

Una vez identificado el plásmido de interés, se liberó el gen *nik1* por restricción con la endonucleasa *XbaI* (Thermo ScientificTM) y el plásmido pBC-NTC fue linearizado con la misma endonucleasa. Para evitar la autoligación del vector vacío al momento de realizar la ligación, se desfosforiló usando la enzima fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo ScientificTM), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Los fragmentos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, la banda se cortó con un bisturí y se purificó siguiendo el protocolo de las columnas de purificación del QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). El plásmido se identificó nuevamente por restricción con la endonucleasa *XbaI* (Thermo ScientificTM). El gen *nik1* purificado fue

clonado en el plásmido pBC-NTC, utilizando la ligasa T4 (Thermo Scientific™) y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Con 5 µL de la ligación, se transformó *E. coli* por choque térmico. Las transformantes se seleccionaron en LB-cloranfenicol (50 µg/ml) adicionado con IPTG/X-Gal. A partir de las colonias blancas se realizaron nuevamente minipreparaciones de ADN plasmídico. El plásmido se identificó nuevamente por restricción con la enzima *Xba*I (Thermo Scientific™). Finalmente, la integridad de la secuencia de nucleótidos del gen *nik1* se analizó determinando el patrón de restricción con las endonucleasas *Bam*H_I, *Eco*R_V, *Hind*III, *Xho*I, *Sac*II y *Xba*I. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.10 Construcción del plásmido pGEM-tub2 con resistencia a benomilo

9.10.1 Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis del gen *tub2*

Trichoderma tiene en su genoma dos genes (*tub1* y *tub2*) que codifican para beta-tubulina que dimerizan con alfa-tubulina para la formación de microtúbulos. En *T. atroviride* una mutación en el gen *tub2* que sustituye una histidina (CAC) por una tirosina (TAC) en el codón 6, le confiere resistencia a benomilo (Goldman et al., 1993). Para esto se utilizó el programa bioinformático Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) para diseñar 3 pares de oligonucleótidos (Tabla 3) con base en la secuencia de nucleótidos obtenida del gen *tub2* de *T. atroviride* (Figura 4). Los oligonucleótidos BRtub2-F y BRtub2-R son los encargados de generar la mutación, se encuentra subrayado el codón y en negrita el nucleótido que genera el cambio.

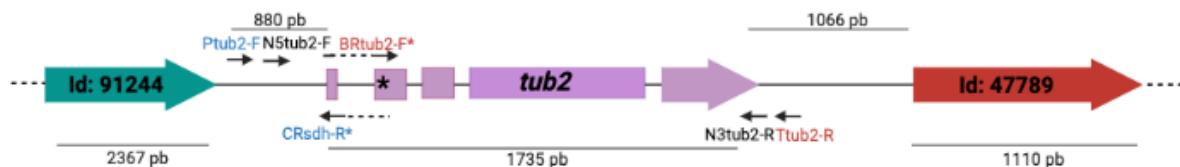


Figura 4. Representación gráfica del gen *tub2*. La secuencia obtenida de la página web <https://genome.jgi.doe.gov/portal/> indica que río abajo se encuentra el gen con Id: 91244 que codifica para una proteína transportadora ABC y río arriba se encuentra el gen con Id: 47789 que codifica para una histona acetiltransferasa. La línea punteada de los oligonucleótidos BRtub2-F y BRtub2-R indica la eliminación del intrón. Cada gen y región intergénica contiene su tamaño en pares de bases. El tamaño de las barras no fue construido a escala. Imagen realizada en <https://www.biorender.com/>.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para generar un alelo mutante de *tub2* resistente a benomilo. Resultado en negrita en los oligonucleótidos BRtub2-F y BRtub2-R se indica la mutación puntual para cambiar el codón que codifica la histidina por el codón que codifica la tirosina.

Nombre	Secuencia de nucleótidos 5' → 3'	Secuencia blanco
Ptub2-F	GCA CAG GAG AGC GTG TTG G	Promotor
Ttub2-R	CTT GCT ACT CTG ACA GAC CGT C	Terminador
BRtub2-F	GCG TGA GAT TGT TTA CAT CCA GAC CGG TCA GTG C	Exon 1 y 2
BRtub2-R	CGG TCT GGA TGT AAA CAA TCT CAC GCA TTT TGA ATG GAG	Exon 1 y 2
N5tub2-F	CCA TCT CTG CCG CGT AGC	Promotor anidado
N3tub2-R	CAG GGC TAC ACA CAC AAA CTT ATG	Terminador anidado

9.10.2 Mutagénesis dirigida del gen *tub2*

Mediante la técnica de PCR se realizó la sustitución de codones mediante el cambio del nucleótido en los cebadores (Figura 5). Para esto se realizó un primer PCR, donde se realizaron dos reacciones de PCR para la amplificación de dos fragmentos, donde en la

reacción 1 se utilizaron los oligonucleótidos Ptub2-F + BRtub2-R; y en la reacción 2 los oligonucleótidos BRtub2-F + Ttub2-R.

En un segundo PCR se fusionaron las dos moléculas utilizando como cebadores y templado los fragmentos obtenidos en el PCR 1.

Por último, en el tercer PCR, se usó el fragmento fusionado del PCR 2 como templado, y los oligonucleótidos anidados N5tub2-F y N3tub2-R; para obtener una mayor especificidad y concentración del producto que se obtuvo al fusionar los fragmentos de ADN del PCR 2. Este amplicón con el gen completo de *Tub2* se nombró Tub2c.

En las reacciones de los tres PCRs se utilizó la enzima Taq ADN Polimerasa High Fidelity (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las condiciones de las reacciones en cadena de la polimerasa fueron: 3 min a 95 °C, 35 ciclos comprendiendo tres pasos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1 min/Kb a 68°C. Las reacciones de PCR se finalizaron a 68°C por 5 min.

Los fragmentos amplificados (por separado) del PCR1, así como el producto final del PCR 3, fueron purificados utilizando columnas de purificación del QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Por otra parte, se realizó la amplificación del gen *tub2* sin promotor pero con la mutación, con el fin de obtener un amplicón más pequeño. Este amplicón se llamó Tub2t, el cual consiste en una amplificación del gen utilizando los cebadores BRtub2-R y N3tub2-F, generando una secuencia del gen sin promotor. La amplificación se realizó utilizando la enzima DreamTaq DNA Polymerasa (Thermo Scientific™). Las condiciones del termociclador fueron: 3 min a 95°C, 35 ciclos comprendiendo tres pasos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1:40 min a 72°C. Por último, las reacciones de PCR finalizaron a 72°C por 5 min.

Los fragmentos de las reacciones de PCR y purificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

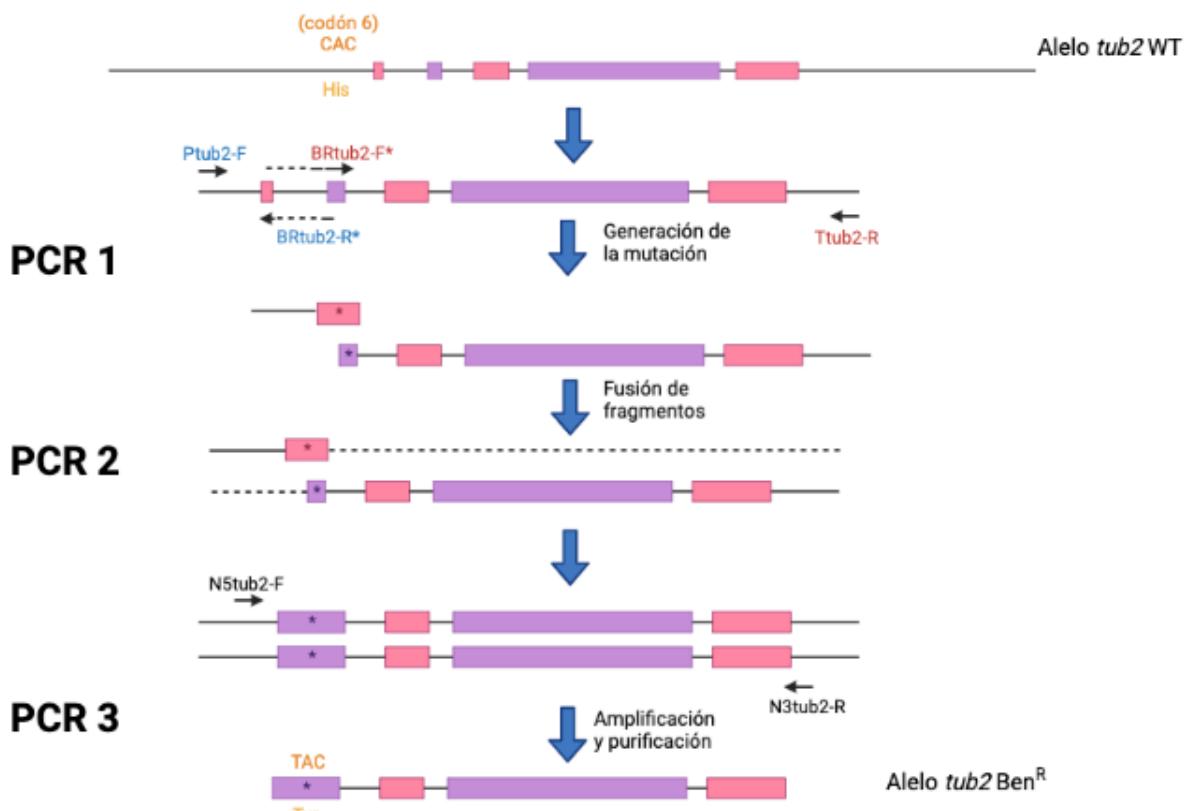


Figura 5. Estrategia de mutagenesis puntual del gen *tub2*. PCR 1, se amplificaron los extremos 5' y 3' del gen *tub2*, con los oligonucleótidos *Ptu2-F* + *BRTu2-R** y *BRTu2-F* + *Ttu2-R*, respectivamente; generando la mutación. PCR 2, se fusionan los fragmentos 5' y 3', usando las secuencias de empalme y se elimina el primer intrón. PCR 3, amplificación del casete con la mutación en el gen, usando los oligonucleótidos anidados *N5tu2-F* y *N3tu2-R*. Imagen realizada en <https://www.biorender.com/>.

9.10.3 Clonación del gen *tub2* en el plásmido pGEM-T easy

El gen *tub2* se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega), como fue indicado anteriormente. De las colonias blancas se extrajeron los plásmidos y se identificaron por restricción, primera aproximación con *EcoRI* (Thermo Scientific™). A los plásmidos positivos, se determinó el patrón de restricción utilizando las endonucleasas *EcoRV*, *PstI*, *SacII* y *XhoI* (Thermo Scientific™). Los fragmentos de las restricciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.10.4 Construcción de otras versiones del gen *tub2* con resistencia a benomilo

Se realizaron dos versiones más del gen *tub2* con la mutación, con el fin de obtener fragmentos más pequeños. A partir de dos plásmidos positivos obtenidos de pGEM-T easy-tub2c (1 y 4), se les realizaron digestiones con las enzimas *PstI* y *SacII* (Thermo ScientificTM), respectivamente. Con un bisturí se cortaron las bandas de 4,969 pb del plásmido 1 y 4,794 pb del plásmido 4; eliminando pequeños fragmentos de 279 y 454 pb, respectivamente. Las bandas se purificaron siguiendo el protocolo de las columnas de purificación del QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Por último, se realizó una autoligación de cada uno de los plásmidos utilizando la enzima T4 DNA Ligasa del kit (Thermo ScientificTM), los cuales fueron llamados pGEM-Tub2c-1p y pGEM-Tub2c-4s.

9.11 Construcción del plásmido pGEM-sdh con resistencia a carboxina

9.11.1 Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis del gen *sdh*

El gen *sdh* codifica la proteína succinato deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico y parte del complejo II del transporte de electrones, sin embargo, al realizar una mutación directa sustituyendo una histidina (CAC) por una leucina (CTC) en el codón 246 del gen *sdh*, le confiere resistencia a carboxina. Para esto se utilizó el programa bioinformático Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) para diseñar 3 pares de oligonucleótidos (Tabla 4) con base en la secuencia de nucleótidos obtenida del gen *sdh* de *T. atroviride* (Figura 6). Los oligonucleótidos CRsdh-F y CRsdh-R son los encargados de generar la mutación.

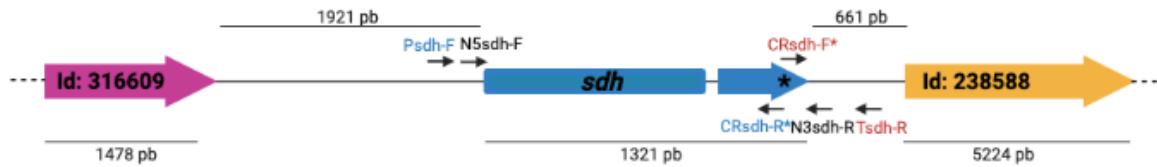


Figura 6. Representación gráfica del gen *sdh*. La secuencia obtenida de la página web <https://genome.jgi.doe.gov/portal/> indica que río abajo se encuentra el gen con Id: 316609 que codifica para una metilasa de ADN, y río arriba se encuentra el gen con Id: 238588 que codifica para una proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos. Cada gen y región intergénica contiene su tamaño en pares de bases. El tamaño de las barras no fue construido a escala. Imagen realizada en <https://www.biorender.com/>.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para generar un alelo mutante de *sdh* resistente a benomilo. Resaltado en negrita en los oligonucleótidos CRsdh-F y CRsdh-R se indica la mutación puntual para cambiar el codón que codifica la histidina por el codón que codifica la leucina.

Nombre	Secuencia de nucleótidos 5' → 3'	Secuencia blanco
Psdh-F	GAC GAC GAG ACC TGA AGT TGC	Promotor
Tsdh-R	GTG CTA GCA ACC TTA CAA GCC	Terminador
N5sdh-F	CCA TCT CTG CCG CGT AGC	Promotor anidado
N3sdh-R	CAG CCC GCA ACA TGA TTA CAA C	Terminador anidado
CRsdh-R	GAG GAT GGT GAG GCA ACG GTA CAG GCT CAT C	
CRsdh-F	GTA CCG TTG CCT CAC CAT CCT CAA CTG CAC GC	

9.11.2 Mutagénesis dirigida del gen *sdh*

Mediante la técnica de PCR, se realizó la sustitución de codones mediante el cambio del nucleótido en los cebadores (Figura 7). Para esto se realizó una primera PCR, donde se realizaron dos PCRs para la amplificación de 2 fragmentos, donde en el PCR1 se utilizaron

los oligonucleótidos Psdh-F + CRsdh-R; y en el PCR2 los oligonucleótidos CRsdh-F + Tsdh-R.

En el segundo paso se realizó otro PCR para la fusión de moléculas utilizando como cebadores y templado los fragmentos obtenidos en el paso 1.

Por último, en el tercer paso se realizó otro PCR usando el fragmento fusionado como templado, y los oligonucleótidos anidados N5sdh-F y N3sdh-R; para obtener una mayor especificidad y concentración del producto que se obtuvo al fusionar los fragmentos de ADN en el paso 2.

En las tres reacciones de PCR se utilizó la enzima Taq DNA Polimerasa High Fidelity (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las condiciones de las reacciones en cadena de la polimerasa fueron: 3 min a 95 °C, 35 ciclos comprendiendo tres pasos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1 min/Kb a 68°C. Las reacciones de PCR se finalizaron a 68°C por 5 min.

Los fragmentos amplificados (por separado) del paso 1, así como el producto final de la PCR del paso 3, fueron purificados utilizando columnas de purificación del QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Los fragmentos de las reacciones de PCR y purificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

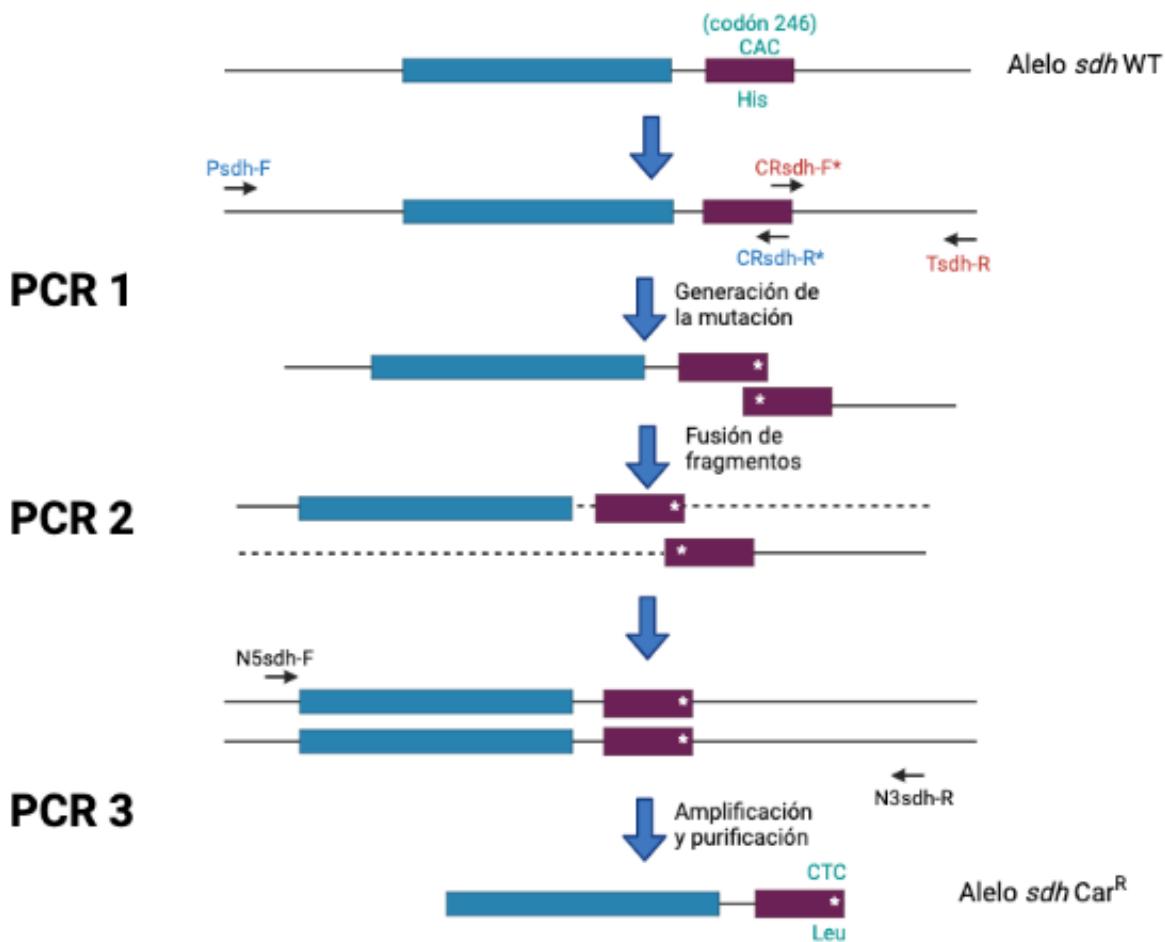


Figura 7. Estrategia de mutagénesis del gen *sdh*. PCR 1, se amplificaron los extremos 5' y 3' del gen *sdh*, con los oligonucleótidos Psdh-F + CRsdh-R* y CRsdh-F + Tsdh-R, respectivamente; generando la mutación. PCR 2, se fusionan los fragmentos 5' y 3', usando las secuencias de empalme y se elimina el primer intrón. PCR 3, amplificación del casete con la mutación en el gen, usando los oligonucleótidos anidados N5sdh-F y N3sdh-R. Imagen realizada en <https://www.biorender.com/>.

9.11.3 Clonación del gen *sdh* en el plásmido pGEM-T easy

El gen *sdh* se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega), como fue indicado anteriormente. De las colonias blancas se extrajeron los plásmidos y se identificaron por restricción, primera aproximación con *EcoRI* (Thermo Scientific™). A los plásmidos positivos, se determinó el patrón de restricción utilizando las endonucleasas *PstI*, *Xhol* y *BamHI*

(Thermo Scientific™). Los fragmentos de las restricciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se analizaron en un fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

9.12 Determinación del patrón de restricción para mapear los genes

Los tamaños de los fragmentos de restricción con las diferentes endonucleasas se determinaron usando el software webcutter 2.0 (<http://heimanlab.com/cut2.html>).

9.13 Diseño de plásmidos

Todas las figuras de los plásmidos fueron diseñadas con ayuda del programa ApE-A plasmid Editor v3.0.9.

9.14 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antifúngicos

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se realizó un experimento con gotas de 5 µL con 10,000 esporas/mL, se utilizó el medio PDA complementado con diferentes concentraciones de cada antifúngico. Para el caso de la nourseotricina se utilizaron concentraciones de 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 µg/mL de NTC; este experimento de sensibilidad fue probado en la cepa silvestre *T. atroviride* y 3 cepas *Δcla4*. Para la resistencia a benomilo se probaron concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 µg/mL de benomilo; mientras que para la resistencia a carboxina se utilizaron las concentraciones 0, 50, 100, 200, 300 y 400 µg/mL. Estos dos antifúngicos fueron probado en las cepas silvestres *T. atroviride* y *T. asperellum*. Se incubaron durante 7 días a 27°C.

9.15 Transformación de *T. atroviride* por el método de Polietilenglicol-CaCl₂

Para transformar protoplastos por el método de polietilenglicol-CaCl₂, se inocularon 1x10⁸ conidias de *T. atroviride* en un matraz con 100 mL de medio de cultivo GYEC (1.5 % de glucosa, 0.3 % de extracto de levadura y 0.5 % de hidrolizado de caseína) y se incubaron a 27°C en agitación orbital constante a 160 rpm por 16 h, el tiempo necesario para la obtención de germínulas. El micelio se colectó por filtración a través de un embudo con un cono de magitel estéril y se lavó con 50 mL de H₂O destilada estéril, con ayuda de una

espátula metálica estéril se recuperó el micelio y se colocó a una caja Petri tarada y se pesaron 0.17 g de micelio. El micelio se colocó en un tubo cónico de 50 mL con 7 mL de solución osmótica (50 mM CaCl₂, 0.5 M manitol y 50 mM MES con pH ajustado a 5.5 con KOH) y 0.1 g de extracto de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich), para degradar la pared celular de las germínulas. El micelio se resuspendió mezclando en vórtex y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 2-3 horas, hasta la formación de protoplastos.

Los protoplastos se filtraron usando un cono de magitel estéril, se lavaron con 3 mL de solución osmótica; este volumen se repartió en 5 microtubos y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 10 min. La pastilla de protoplastos de cada tubo fue resuspendida en un volumen mínimo de solución osmótica (104 µL a cada tubo), después se juntaron en un solo tubo, obteniendo un volumen final de 520 µL, se mezclaron y se dividieron en 2 tubos. Los protoplastos del tubo 1 se mezclaron con 10 µg de plásmido en 40 µL de solución osmótica. Los protoplastos del tubo 2 fueron utilizado como control donde únicamente se agregaron 40 µL de solución osmótica. Después de 20 min de incubación en hielo, se les agregaron 300 µL de PEG-6000 al 40% a 42°C y se mezclaron por inversión. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente por 30 min.

El tubo 1 se vertió en 10 mL de top agar (PDB, 1 M sorbitol y agar bacteriológico al 0.7 %) sobre una caja Petri con PDA selectivo (PDA, nourseotricina (100 µg/ml), benomilo (2 µg/mL) o carboxina (250 µg/mL) y 1 M sorbitol). El tubo 2 se mezcló en agar suave y se vertió en una caja Petri con PDA selectivo para un control negativo y en PDA sin selección como un control positivo para verificar la viabilidad de los protoplastos. Los cultivos se incubaron a 27°C hasta la formación de colonias resistentes al antibiótico, aproximadamente de 4-6 días.

9.16 Prueba de estabilidad

Las transformantes de *T. atroviride* fueron seleccionadas en tres cultivos monospóricos en medio PDA selectivo, con el fin de seleccionar transformantes estables del hongo y de limpiar el fondo genético (núcleos no transformados) para obtener homocariontes con solo núcleos transformados. A partir del tercer paso, se cortaron colonias y se inocularon en medio PDA sin selección hasta la esporulación de las cepas. Para seleccionar las

transformantes estables, se colocaron gotas de 5 µL con 1000 esporas en suspensión en medio PDA adicionado con 0.5% de tritón X-100 con y sin selección, y se incubaron a 27°C por 3 días para las pruebas de nourseotricina y 6 días para las pruebas con benomilo. Los conidios capaces de germinar y crecer en el medio selectivo son las transformantes estables que han integrado el ADN exógeno en su genoma. Los conidios incapaces de germinar y crecer corresponden a transformantes inestables que mantienen el plásmido de forma autoreplicativa bajo selección, pero que lo pierden cuando se cultiva en medio de cultivo sin selección.

9.17 Ensayo de segregación del alelo *tub2* resistente a benomilo

Los conidios se cuantificaron en una cámara de Neubauer y se generaron tubos con 1000 esporas/mL. Posteriormente, se inocularon 200 µL con 200 esporas en medio PDA + tritón 0.5% sin selección y con selección (2 µg/mL de benomilo). Los cultivos se incubaron a 27°C durante 3 días. El porcentaje de segregación se determina usando la siguiente formula: %segregación=(CCS*100)/CSS. CCS corresponde al número de colonias en el medio de cultivo selectivo y CSS corresponde al número de colonias formadas en el medio de cultivo sin selección.

9.18 Identificación del plásmido pBC-NTC en *T. atroviride* por PCR

Para identificar el plásmido en transformantes de *T. atroviride* se realizó un PCR punto final, utilizando oligonucleótidos específicos para el marcador de selección NTC, NTC-F (GTT AAC GGA CGG ACG CAG AGA GAA G) y NTC-R (GTT AAC TTA GGG GCA GGG CAT GCT CAT G) que amplifican una banda de 1.4 kb. El programa utilizado fue: 3 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 64°C y 90 s a 72°C; y finalizando con 5 min a 72°C. Por otro lado, se realizó una PCR usando los oligonucleótidos gpd-F (GCCGATGGTGAGCTCAAGGG) y gpd-R (GGTCGAGGACACGGCGGG) específicos para el gen *gpd* como un control interno. El programa utilizado fue: 3 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 20 s a 72°C; y finalizando con 5 min a 72°C. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) adicionado con bromuro de etidio (10 µg/mL).

10 RESULTADOS

10.1 Construcción del plásmido pBC-NTC

10.1.1 Linealización y desfosforilación del plásmido pCB1004 y obtención del fragmento NTC

Con el objetivo de eliminar el gen *hph* del plásmido pCB1004, se realizó una restricción con la endonucleasa *HpaI*. El plásmido lineal con extremos romos se desfosforiló con la enzima Fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo Scientific™). El plásmido pCB1004 está formado por 4829 pb, mientras que el gen *hph* mide 1429 pb; por lo tanto, al eliminar el gen *hph* se obtiene el vector linealizado de 3400 pb (Figura 8).

Para obtener el fragmento NTC se utilizó el vector pGEM-NTC que tiene clonado el gen *nat1* que confiere resistencia a nourseotricina en hongos. El fragmento NTC se liberó por restricción con EcoRI, obteniendo un fragmento de 1432 pb (Figura 6). Para llenar los extremos cohesivos, el fragmento NTC fue tratado con la enzima Klenow Fragment (Thermo Scientific™) la cual muestra una actividad polimerasa 5' → 3', rellenando así los extremos y convirtiéndolos en extremos romos.

Todas las manipulaciones de los fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. La figura 8 muestra los tamaños moleculares son los correctos y se procedió a ligar ambas moléculas.

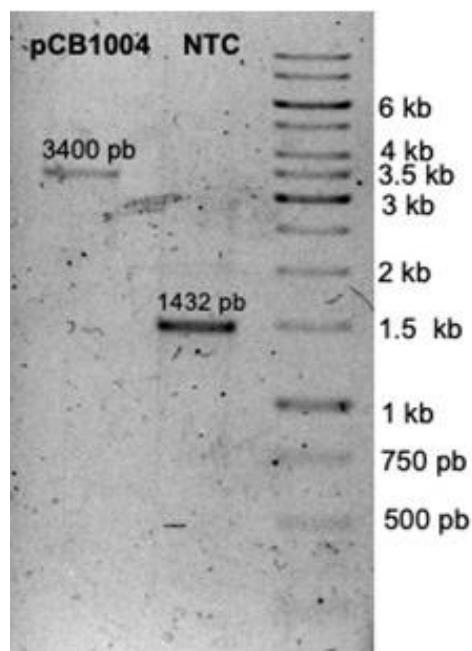


Figura 8. El vector pCB1004 sin marcador de selección y el fragmento NTC. Primer carril, fragmento lineal del plásmido pCB1004 carente del marcador de selección *hph* con un tamaño de 3.4 kb. Segundo carril, fragmento de 1432 pb del casete NTC de resistencia a nourseotricina. El marcador de peso molecular 1 kb se utilizó como referencia para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos de ADN.

10.1.2 Ligación del vector con el fragmento NTC

Se realizó la ligación del vector pBC con el fragmento NTC con la enzima T4 ligasa y se incubó a 4°C durante 18 h. Se utilizó como control la misma reacción reemplazando el fragmento NTC por agua HPLC para verificar que el plásmido haya sido linearizado y desfosforilado exitosamente, sin realizar la autoligación. A este plásmido construido lo llamaremos pBC-NTC. Posteriormente, se transformó *E. coli*, obteniendo únicamente una colonia blanca.

10.1.3 Análisis por restricción del plásmido construido (pBC-NTC)

El plásmido obtenido fue analizado por medio de un patrón de restricción y los tamaños moleculares de los fragmentos analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La orientación de NTC se determinó con las enzimas de restricción *KpnI* y *Sall*, que

tienen sitios de corte tanto en el polilinker como en el fragmento NTC; así como *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *SacI*, *XbaI* y *XhoI*, son enzimas que únicamente cortan en el sitio de clonación múltiple, por lo tanto, el plásmido únicamente se linealiza obteniendo una sola banda de 4,832 pb, por la suma del fragmento NTC más el vector (Figura 9).

En las restricciones con *KpnI* se obtuvieron dos bandas, una de 1.6 kb y la otra de 3.2 kb, mientras que para *SalI* se obtuvo una banda de 2 kb y otra de 2.9 kb aproximadamente. Por lo tanto, el plásmido analizado presenta las bandas con los tamaños esperados, indicando que la orientación del gen *nat1* quedó como se observa en la Figura 10. Las endonucleasas *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *SacI*, *XbaI* y *XhoI* solo cortan en el sitio de múltiple clonación, linearizando el plásmido y obteniendo en todas las restricciones una banda única de 4.8 kb que corresponde al tamaño de pBC-NTC (Figura 9) (Tabla 5).

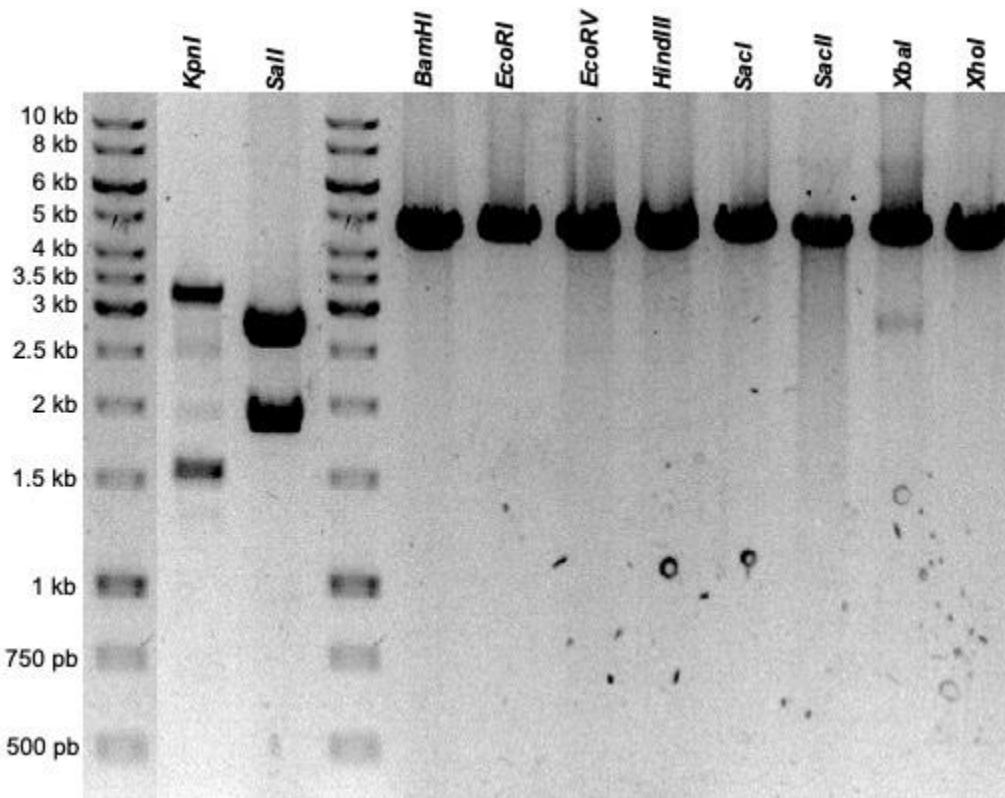


Figura 9. Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC. Plásmido pBC-NTC se cortó con las diferentes endonucleasas indicadas. Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb para estimar los tamaños moleculares.

Tabla 5. Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC. Se muestran los sitios de corte en el gen y el vector de cada endonucleasa; así como las bandas esperadas.

Enzima	Sitio de corte en el gen (pb)	Sitio de corte en el vector (pb)	Bandas esperadas (kb) →	Bandas esperadas (kb) ←
<i>KpnI</i>	887	657	1.8, 2.9	1.5, 3.3
<i>Sall</i>	495	674	1.5, 3.3	1.9, 2.9
<i>BamHI</i>	No corta	719	4.8	4.8
<i>EcoRI</i>	No corta	701	4.8	4.8
<i>EcoRV</i>	No corta	697	4.8	4.8
<i>HindIII</i>	No corta	689	4.8	4.8
<i>SacI</i>	No corta	759	4.8	4.8
<i>SacII</i>	No corta	750	4.8	4.8
<i>XbaI</i>	No corta	731	4.8	4.8
<i>XhoI</i>	No corta	668	4.8	4.8

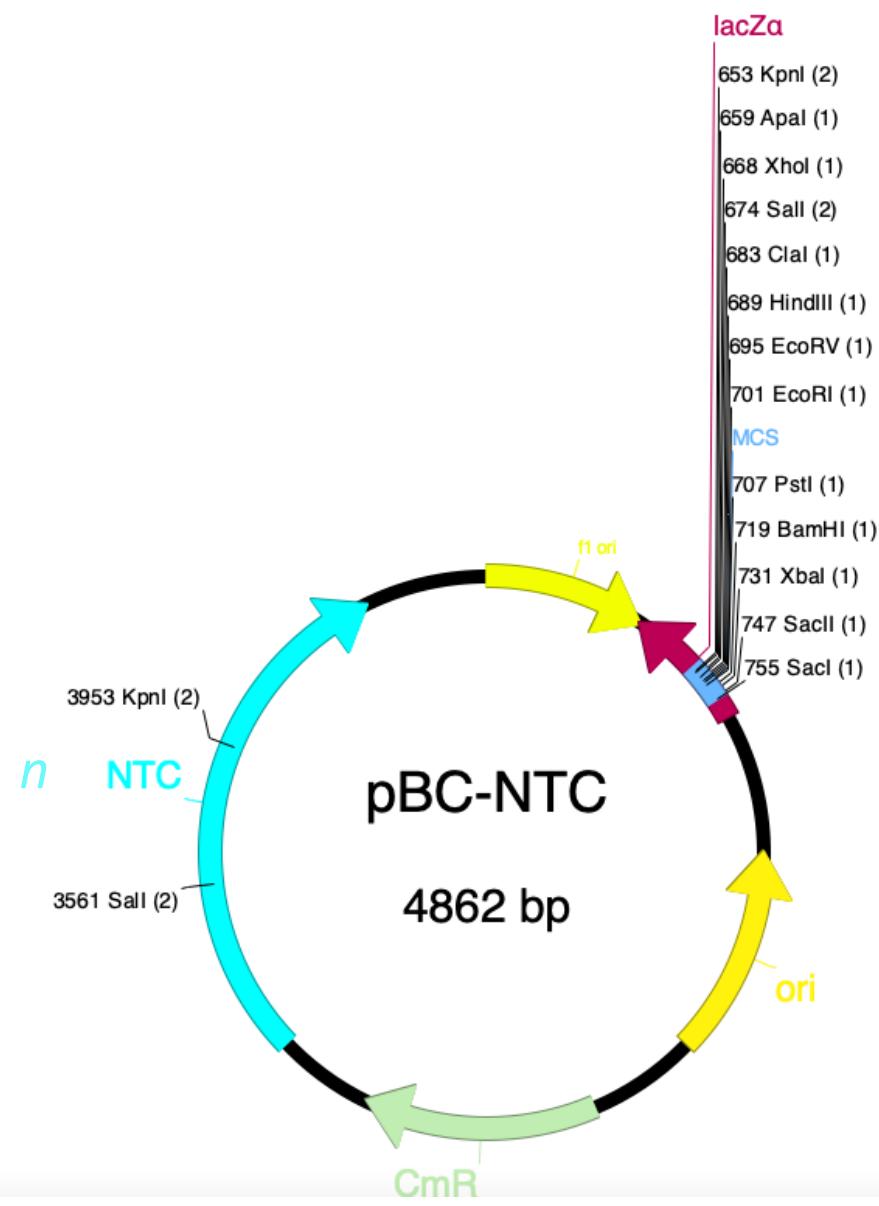


Figura 10. Plásmido pBC-NTC con resistencia a nourseotricina. Este plásmido contiene el gen *nat1* que codifica la nourseotricina acetil transferasa, que confiere resistencia a la nourseotricina; CmR, gen de resistencia a cloranfenicol; ori, origen de replicación; MCS, sitio de múltiple clonación; LacZ, codifica para la β -galactosidasa; f1 Ori, origen de replicación del bacteriófago f1. Plásmido diseñado en el programa ApE- A plasmid Editor v3.0.9.

10.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de NTC

Para seleccionar las transformantes de *T. atroviride* utilizando el plásmido pBC-NTC, primero se realizó un ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria. Se inoculó la cepa silvestre y las cepas mutantes $\Delta clav4-16$, $\Delta clav4-19$ y $\Delta clav4-23$ que tienen resistencia a higromicina B, fueron consideradas para probar la funcionalidad del plásmido pBC-NTC para la complementación de mutantes. Todas las cepas se ven afectadas desde la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 11), sin embargo, es más significativo en la cepa silvestre. En 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ prácticamente la cepa silvestre y la $\Delta clav4-16$ ya no crecen. Por lo tanto, se consideró la concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para seleccionar colonias transformadas resistentes a nourseotricina.

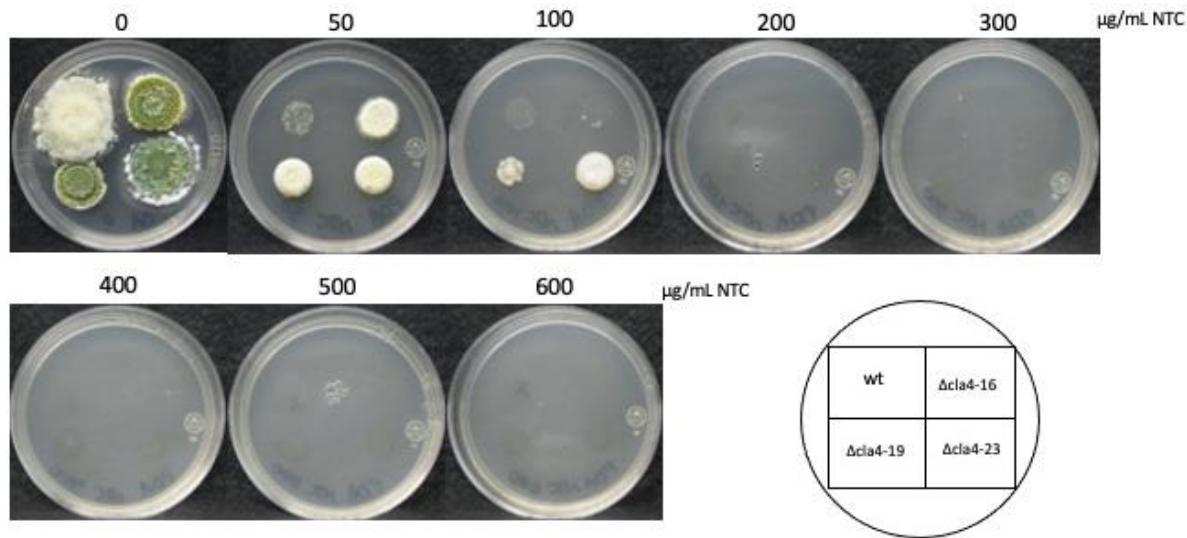


Figura 11. Concentración mínima inhibitoria de la nourseotricina. Se utilizó medio PDA y se colocaron gotas de 5 μL con 10 millones de esporas/mL. Se incubaron a 27°C durante 7 días. Abajo se muestra la plantilla que indica el nombre de la cepa cada gota.

10.3 Transformación de *T. atroviride* con el plásmido pBC-NTC por el método de PEG- CaCl_2

Para determinar la funcionalidad del plásmido pBC-NTC, se transformó *T. atroviride* y se obtuvieron un total de 307 transformantes resistentes a NTC (Figura 12). El control positivo mostró una alta viabilidad de los protoplastos y la ausencia de colonias resistentes a NTC en el control negativo indica que, la resistencia al NTC está directamente asociada a

la presencia del plásmido pBC-NTC. Estos resultados muestran evidencia contundente sobre la función del marcador de selección NTC, indicando que el promotor del gen *gpd* de *A. nidulans* es funcional en *T. atroviride*, expresando la región codificante del gen *nat1* que codifica una enzima funcional que inactiva la nourseotricina.

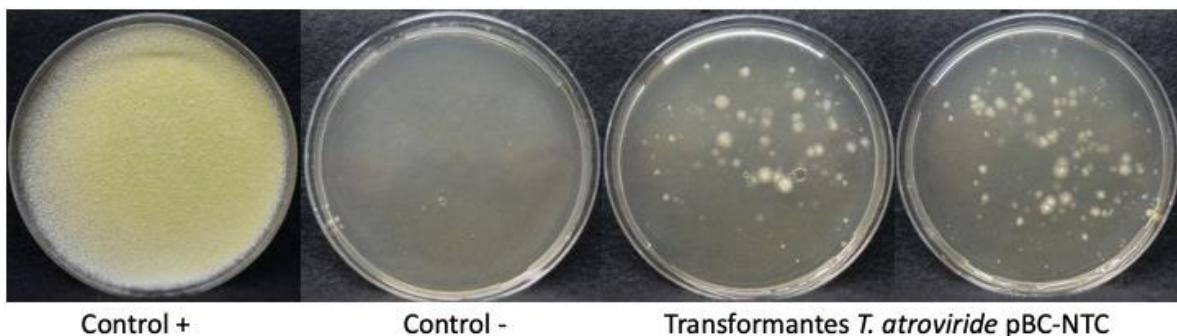


Figura 12. Transformantes de *T. atroviride* resistentes a NTC. Control positivo, los protoplastos se inocularon en PDA adicionado con 1M de sorbitol sin antibiótico, para observar la viabilidad al final de la manipulación. Control negativo, los protoplastos sometidos al mismo proceso de transformación sin plásmido, cultivados en medio selectivo (PDA +1 M sorbitol + nourseotricina 150 µg/mL). Transformantes, los protoplastos transformados con pBC-NTC y cultivados en medio selectivo. Los cultivos se incubaron a 27°C durante 6 días.

10.3.1 Estabilidad de transformantes resistentes a NTC

Un fenómeno común en la transformación de *T. atroviride* es la generación de transformantes inestables cuando el ADN exógeno no tiene homología a su genoma. Las transformantes cultivadas en un medio sin selección pierden el plásmido desde la primera generación de esporas. Por otro lado, las transformantes estables integran el plásmido en su genoma solo por recombinación homóloga, manteniendo la resistencia a través de las generaciones obtenidas sin selección (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2020). Se analizaron 9 colonias transformantes, seleccionadas por resistencia a nourseotricina durante tres cultivos monospóricos; sin embargo, debido a la inestabilidad se perdieron dos colonias durante el proceso. Posteriormente, al realizarles una prueba de estabilidad a las 7 colonias restantes del tercer paso monospórico, estas crecieron únicamente en PDA, pero no en PDA con selección (datos no mostrados). Indicando que las 7 colonias analizadas perdieron el plásmido al ser cultivadas previamente en un medio de PDA sin selección.

10.4 Identificación del plásmido pBC-NTC en *T. atroviride* por PCR

Con el propósito de determinar la presencia de la construcción plasmídica en las transformantes con resistencia a NTC, se utilizó el ADNg de las 7 transformantes seleccionadas y se amplificó el marcador de selección NTC, el gen *nat1*. Se realizó la amplificación del gen *gpd* como un control interno de las transformantes. Como control negativo se utilizó el ADNg de la cepa silvestre, y como control positivo el plásmido pBC-NTC. En todas las muestras se amplificó una banda de aproximadamente 250 pb, correspondiente al gen *gpd* (Figura 13B), excepto en el plásmido, indicando que la calidad del ADN es apropiada para detectar los genes de interés. Para determinar la presencia del plásmido pBC-NTC, se realizaron reacciones de PCR usando oligonucleótidos específicos para el gen *nat1*. En todas las muestras de ADN de las transformantes crecidas en un medio con selección (PDA con NTC) se amplificó una banda correspondiente al gen *nat1*; mientras que las crecidas en medio sin selección (sólo PDA), no se amplificó el gen (Figura 13A). Como fue descrito previamente por Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2020, los plásmidos sin homología al genoma de *Trichoderma* no se integran, generando transformantes inestables que propagan el plásmido cuando las transformantes se mantienen bajo presión selectiva, pero pierden rápidamente el plásmido cuando se cultivan en un medio sin selección, consecuentemente se vuelven sensibles al antibiótico. Estos resultados moleculares relacionan directamente la resistencia a nourseotricina con la presencia del gen *nat1*, indicando, además, que la región regulatoria del gen *gpd* es funcionalmente intercambiable entre *Aspergillus* y *Trichoderma*.

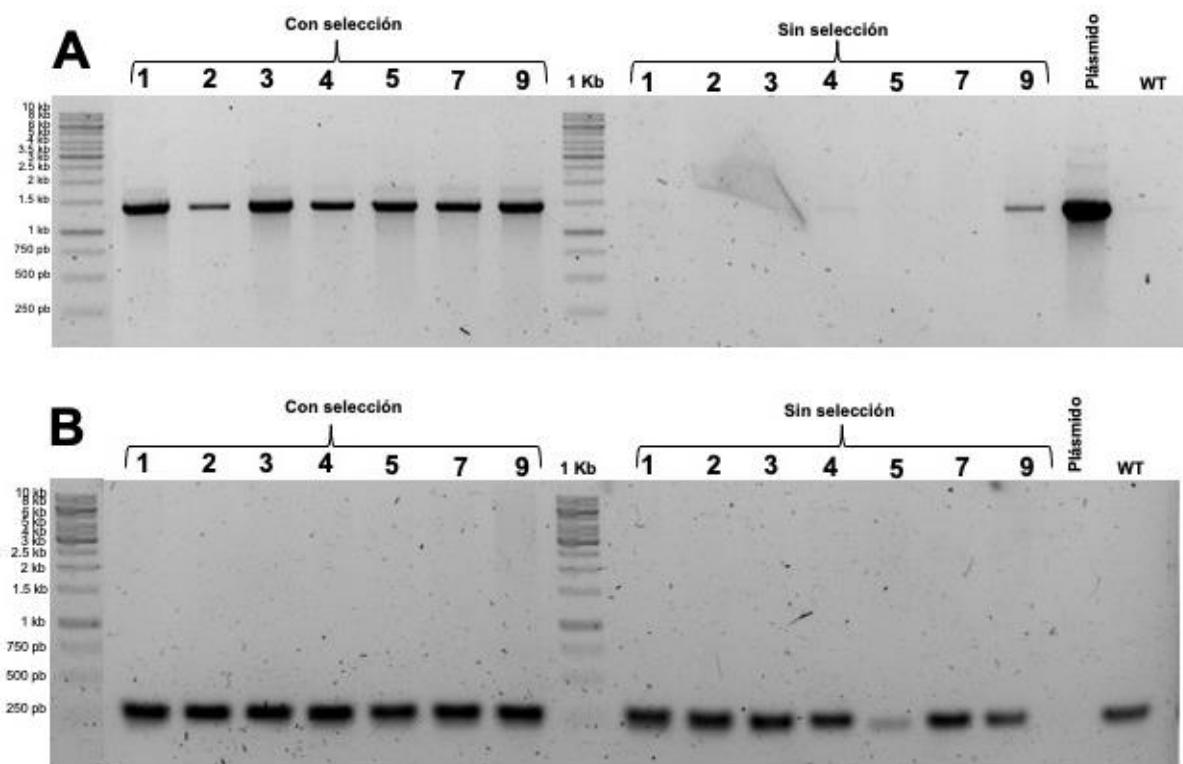


Figura 13. Identificación del plásmido pBC-NTC. A. Amplificación del gen *nat1* (1.4 Kb) por PCR. **B.** Amplificación del gen *gpd*. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

10.5 Construcción del plásmido pBC-NTC con *nik1*

10.5.1 Clonación de *nik1* en pGEM-T easy

El gen *nik1* se amplificó mediante PCR, obteniendo una banda de 6,310 pb (Figura 14A) que corresponde al tamaño esperado. El gen *nik1* se clonó en el plásmido comercial pGEM-T easy. Para identificar plásmidos recombinantes, minipreparaciones plasmídicas de colonias blancas se analizaron por restricción con la endonucleasa *EcoRI*, cortando en ambos lados del sitio de clonación del vector y el gen en la posición 3,964 pb y 4,624 pb. Por lo tanto, el plásmido que porta *nik1* debe mostrar 4 bandas; 1) 3,000 Kb; 2) 3,964; 3) 660 pb; y 4) 1,686 pb. Únicamente el plásmido 3 mostró el patrón de restricción esperado (Figura 14B). A partir del plásmido 3 se realizó un patrón de restricción con las endonucleasas *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *PstI*, *SacI*, *Xhol* y *XbaI* (Figura 14C) (Tabla 6). El patrón de

restricción de pGEM-T easy-nik1-3 coincide con las bandas esperadas, indicando que tienen clonado el gen *nik1* en la orientación indicada en la figura 15.

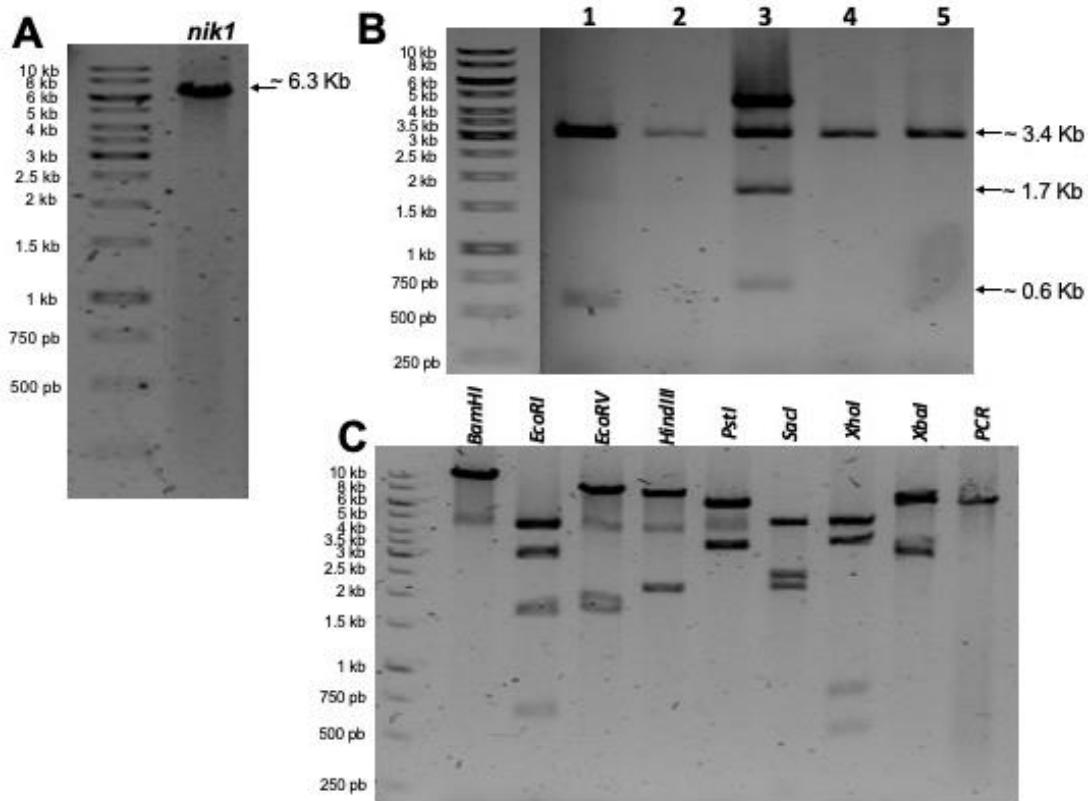


Figura 14. Clonación del gen *nik1* en el plásmido pGEM t-easy. A. Amplificación de *nik1* (6.3 kb) por PCR. **B.** Identificación por restricción con *EcoRI* de un plásmido de pGEM t-easy con *nik1*. **C.** Patrón de restricción de pGEM-nik1-3 utilizando las endonucleasas que se mencionan en la figura. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

Tabla 6. Tamaño de fragmentos esperados del patrón de restricción del plásmido

pGEM-T easy-nik1. Se muestran los sitios de corte en el gen y el vector de cada endonucleasa; así como los tamaños teóricos de los fragmentos de restricción.

Enzima	Sitios de corte en gen (kb)	Sitio de corte en el vector (pb)	Bandas esperadas → (kb)	Bandas esperadas ← (kb)
<i>BamHI</i>	1.3	No corta	9.3	9.3
<i>EcoRI</i>	3.9, 4.6	52, 70	0.6, 1.7, 3, 4	0.6, 1.7, 3, 4
<i>EcoRV</i>	4.1, 5.9	No corta	1.8, 7.5	1.8, 7.5
<i>HindIII</i>	3.8, 6	No corta	2.2, 7.1	2.2, 7.1
<i>PstI</i>	2.8	88	2.9, 6.4	3.4, 5.9
<i>SacI</i>	1.3, 3.6, 3.8	109	1.4, 2.2, 0.2, 5.4	2.4, 0.2, 2.2, 4.4
<i>XbaI</i>	0.7, 1.5, 2, 5.6	No corta	0.8, 0.5, 3.6, 4.3	0.8, 0.5, 3.6, 4.3
<i>XbaI</i>	1, 6.3	No corta	3, 6.3	3, 6.3

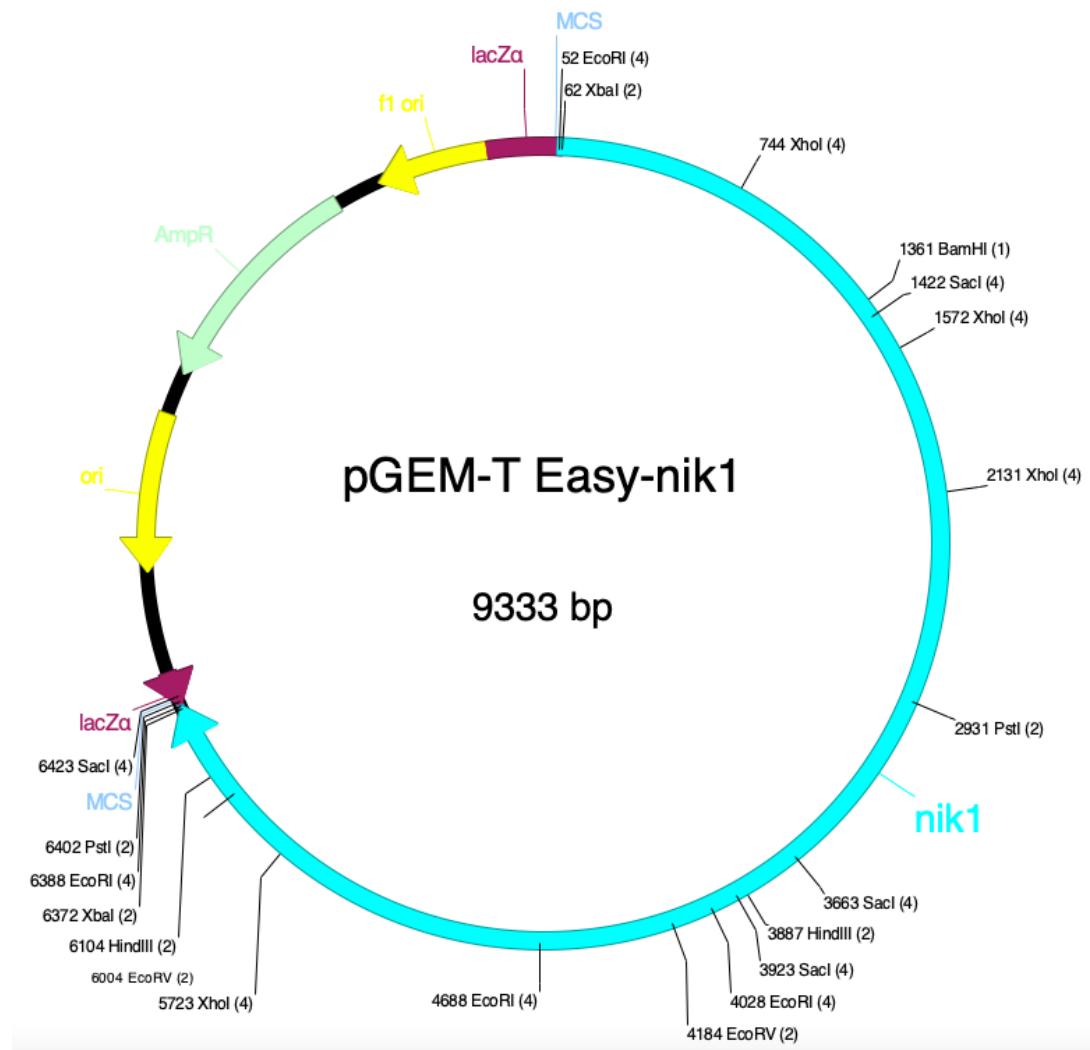


Figura 15. Vector de clonación pGEM-T easy con el gen *nik1*. Este plásmido contiene el gen clonado de *nik1*; AmpR, gen de resistencia a ampicilina; ori, origen de replicación; MCS, sitio de múltiple clonación; LacZ, codifica para la β-galactosidasa; f1 Ori, origen de replicación del bacteriófago f1. Plásmido diseñado en el programa ApE- A plasmid Editor v3.0.9.

10.5.2 Clonación de *nik1* en pBC-NTC

Para construir este plásmido, el gen *nik1* se liberó por restricción con *Xba*I del plásmido pGEM-T easy-nik1-3 y el plásmido pBC-NTC (Figura 10) se linealizó con la misma enzima. 12 colonias blancas resistentes a cloranfenicol se analizaron por restricción con la

endonucleasa *EcoRI* (Figura 16). Debido a que existen dos posibles orientaciones del gen al insertarse en el vector, se esperarían dos diferentes patrones de bandas al cortarlo con *EcoRI* (Tabla 7). Tomando como referencia la dirección de LacZ, la orientación en sentido (\rightarrow) generará tres fragmentos de restricción de 8.7, 1.7 y 0.66 kb. La dirección antisentido (\leftarrow) genera fragmentos de 6.5, 3.9 y 0.66 Kb. Se identificaron 5 plásmidos que portan el gen *nik1*, el plásmido 1 y 9 portan el gen en orientación sentido (\rightarrow), mientras que los plásmidos 2, 3 y 8 pertenecen a la dirección antisentido (\leftarrow) (Figura 16). Posteriormente, se determinó un patrón de restricción de los plásmidos pBC-NTC-*nik1*-1, 3, 8 y 9 con las endonucleasas *BamHI*, *EcoRV*, *HindIII*, *Xhol*, *SacII* y *XbaI* (Figura 17). El patrón de bandas coincide con el esperado para todos los patrones de bandas generados con las diferentes endonucleasas, indicando que el plásmido pBC-NTC porta el gen *nik1* en ambas direcciones. La clonación del gen *nik1* en pBC-NTC quedó como se muestra en la figura 18, correspondiente al plásmido pBC-NTC-*nik1*-9, el cual fue utilizado para experimentos posteriores. Con el plásmido pBC-NTC que porta el gen *nik1* se transformó una cepa mutante $\Delta nik1$, obteniendo crecimiento en el control negativo sin plásmido similar a la transformación donde se incluyó el plásmido. El experimento se repitió incrementando la concentración a 200 μ g/mL de NTC e higromicina B, pero los resultados fueron similares.

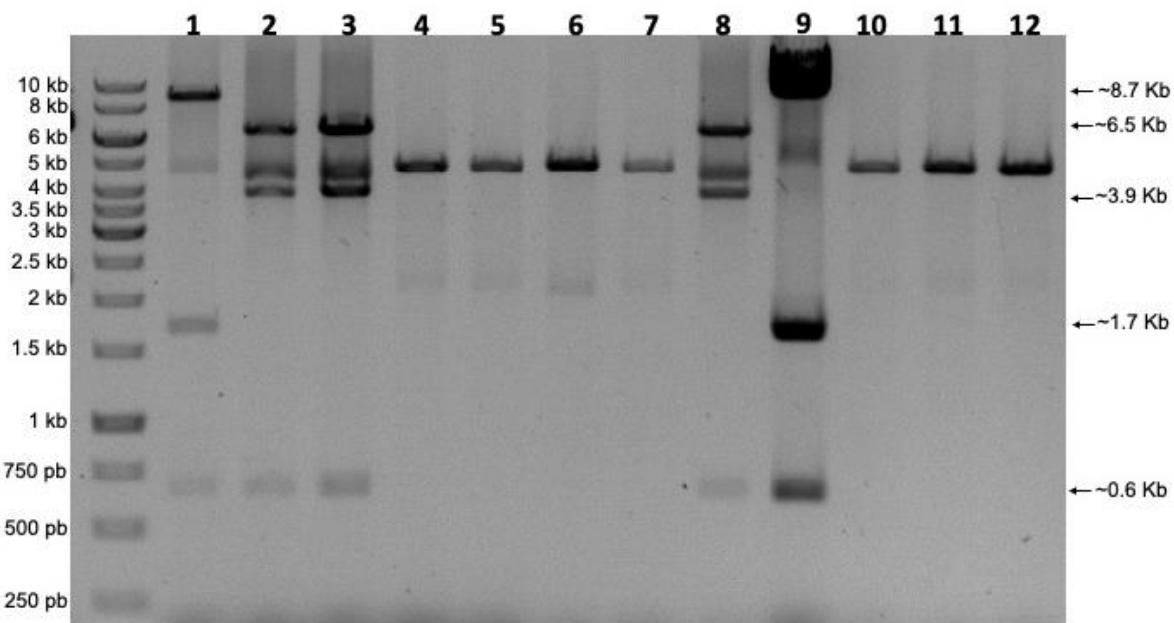


Figura 16. Restricción con *EcoRI* del plásmido pBC-NTC-nik1. Análisis por restricción con la endonucleasa *EcoRI* de los 12 plásmidos extraídos. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1kb.

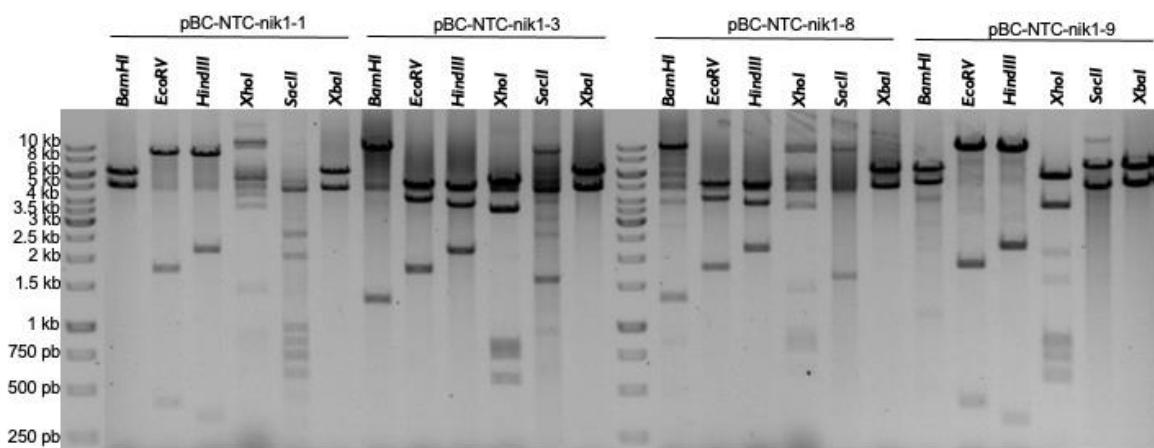


Figura 17. Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC-nik1. Análisis por restricción de los plásmidos pBC-NTC-nik1-1,3,8 y 9 utilizando las endonucleasas que se mencionan en la figura. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1kb.

Tabla 7. Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC-nik1. Se muestran los sitios de corte en el gen y el vector de cada endonucleasa; así como las bandas esperadas.

Enzima	Sitios de corte en gen (kb)	Sitio de corte en el vector (pb)	Bandas esperadas (kb) →	Bandas esperadas (kb) ←
<i>BamHI</i>	1.3	719	5, 6.1	1.3, 9.8
<i>EcoRV</i>	4.1, 5.9	697	1.8, 0.368, 8.9	1.8, 4.1, 5.2
<i>HindIII</i>	3.8, 6	689	2.2, 0.270, 8.6	2.2, 3.8, 5.1
<i>Xhol</i>	0.680, 1.5, 2, 5.6	668	0.828, 0.559, 3.6, 0.651, 5.5	0.680, 0.828, 0.559, 3.9, 5.4
<i>SacII</i>	4.7	750	4.7, 6.4	1.6, 9.5
<i>XbaI</i>	No corta	731	4.8, 6.3	4.8, 6.3
<i>EcoRI</i>	4.1 y 4.8	701	8.7, 1.7, 0.66	6.5, 3.9, 0.66

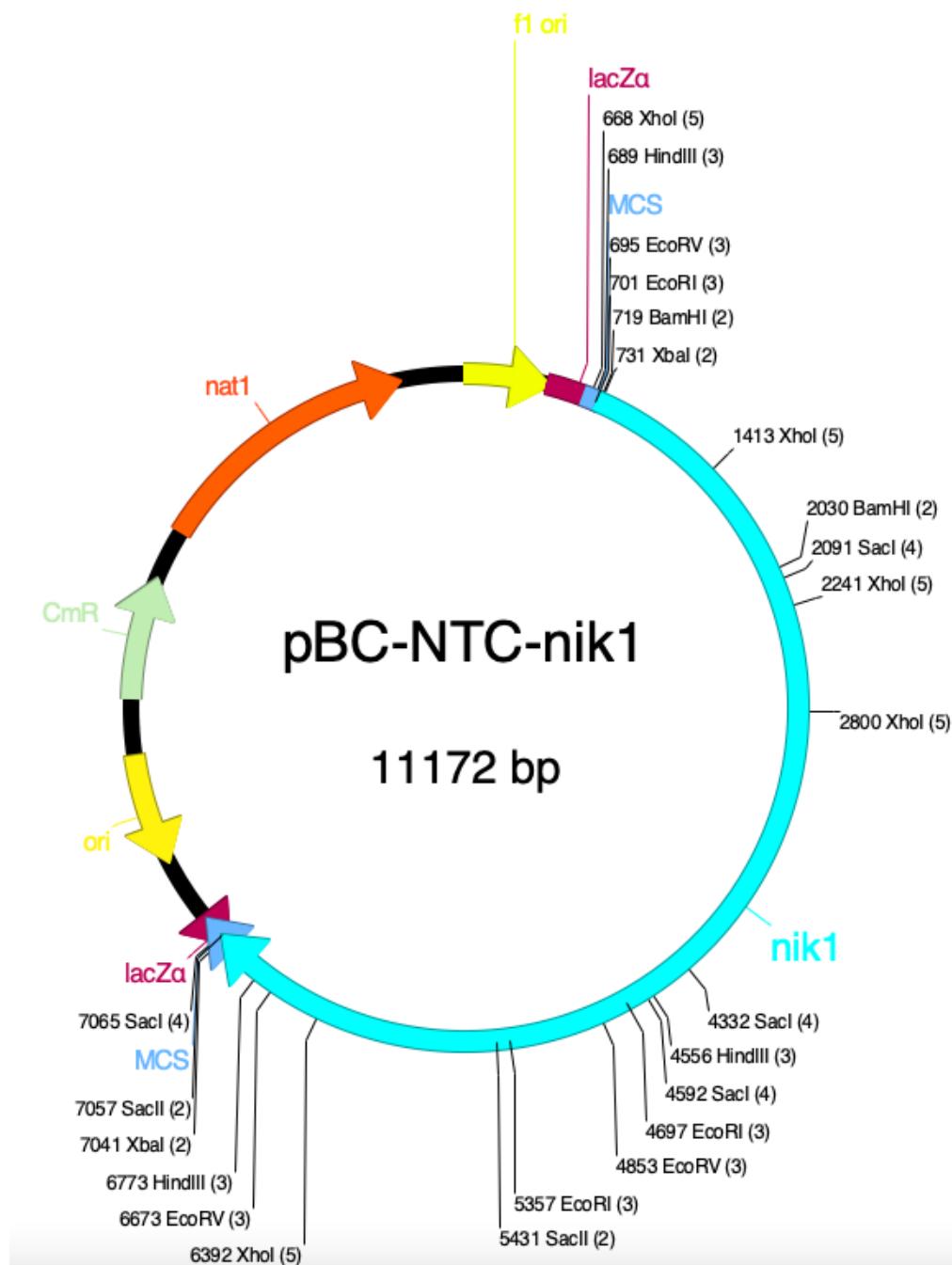


Figura 18. Plásmido pBC-NTC-nik1. Este plásmido contiene el gen clonado de *nik1*; gen *nat1* que codifica la nourseotricina acetil transferasa, que confiere resistencia a la nourseotricina; CmR, gen de resistencia a cloranfenicol; ori, origen de replicación; MCS, sitio de múltiple clonación; LacZ, codifica para la β -galactosidasa; f1 Ori, origen de replicación del bacteriófago f1. Plásmido diseñado en el programa ApE- A plasmid Editor v3.0.9.

10.6 Construcción del plásmido pBC-NTC con *cla4*

10.6.1 Clonación de *cla4* en pGEM-T easy

El gen *cla4* que codifica una proteína cinasa MAPKKKK se amplificó de igual manera mediante PCR usando como templado el ADNg de *T. atroviride*. Se analizó por electroforesis y se observó una banda de 5,460 pb (Figura 19A), que corresponde al tamaño esperado. Posteriormente el gen *cla4* se clonó en el plásmido comercial pGEM-T easy (Promega), con 5 µL de ligación, se obtuvieron 17 colonias, a las cuales se les hizo extracción de ADN plasmídico. Para identificar plásmidos recombinantes, se analizaron mediante una restricción con *EcoRI*, liberando 2 bandas: 1) 3 Kb que corresponde al vector y 2) 5.4 Kb que corresponde al gen (Figura 19B). Con estos datos se determina que 5 plásmidos de los 17 analizados, corresponden al patrón esperado. Los plásmidos obtenidos fueron pGEM-T easy-*cla4*-1, 4, 11, 15 y 17; los cuales fueron analizados mediante un patrón de restricción más amplio con las endonucleasas *PstI*, *Sall*, *HindIII* y *EcoRI* (Figura 20) (Tabla 8). El patrón de restricción de los 5 plásmidos obtenidos coincide con las bandas esperadas, y se determina que el gen *cla4* se insertó en el plásmido pGEM-T easy en ambas direcciones. Los plásmidos 1, 4, 11 y 15 portan el gen *cla4* en sentido, mientras que el plásmido 17 porta al gen *cla4* en dirección antisentido tomando como referencia la dirección de *LacZ* (Figura 21).

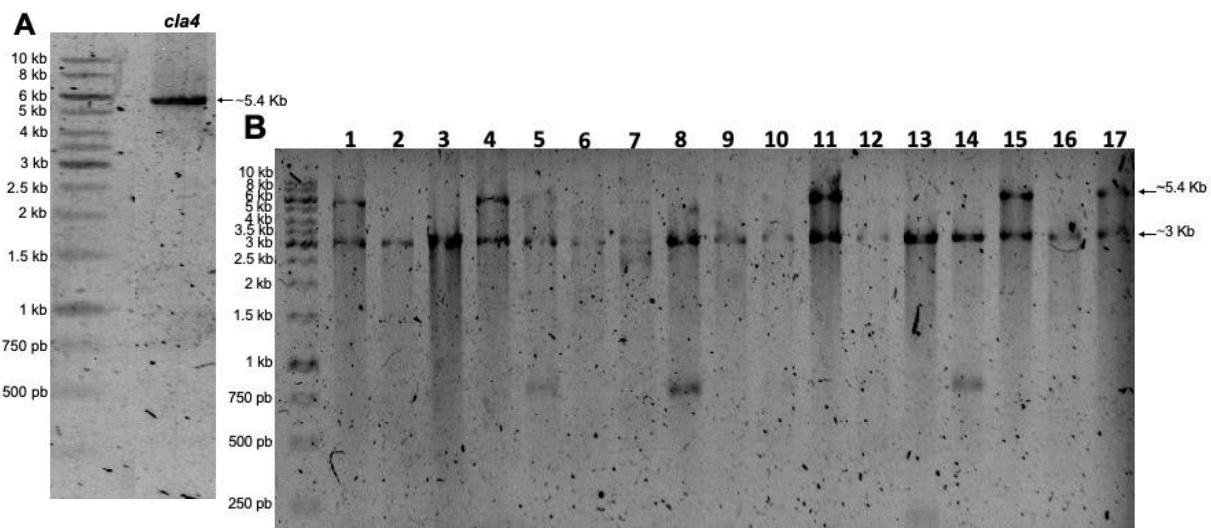


Figura 19. Clonación del gen *cla4*. **A.** Amplificación de *cla4* (5.4 kb) por PCR. **B.** Identificación por restricción con *EcoRI* de 17 plásmidos de pGEM t-easy con *cla4*. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

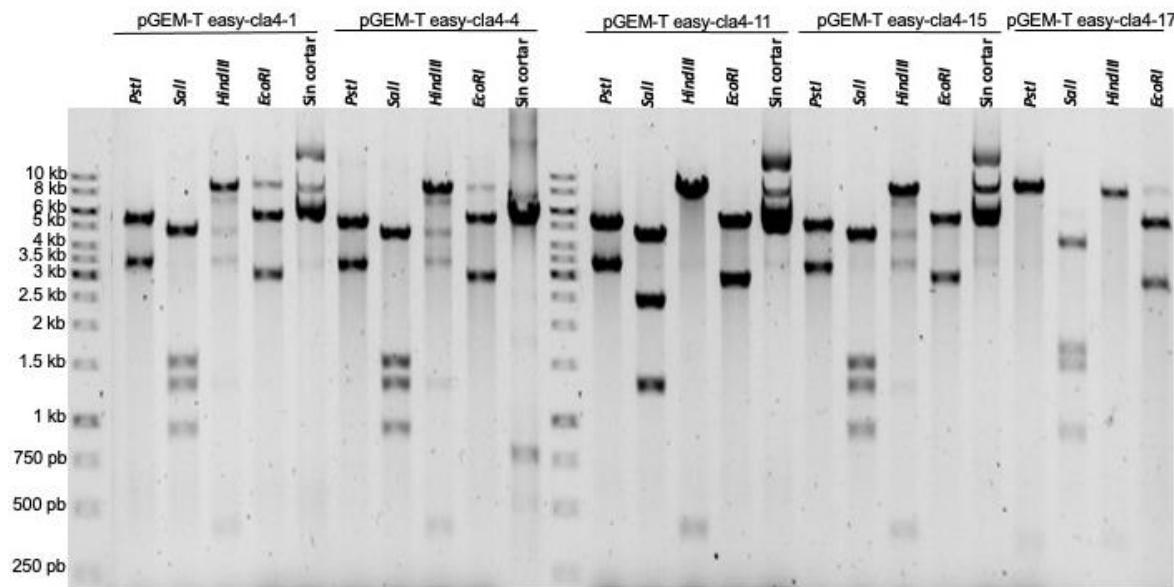


Figura 20. Patrón de restricción de los plásmidos pGEM-T easy-*cla4*. Análisis por restricción de los plásmidos pGEM-T easy-*cla4*-1, 4, 11, 15 y 17 utilizando las endonucleasas que se mencionan en la figura. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1kb.

Tabla 8. Patrón de restricción del plásmido pGEM-T easy-cla4. Se muestran los sitios de corte en el gen y el vector de cada endonucleasa; así como las bandas esperadas.

Enzima	Sitios de corte en gen (kb)	Sitio de corte en el vector (pb)	Bandas esperadas (kb) →	Bandas esperadas (kb) ←
<i>PstI</i>	5.1	88	3.3, 5.1	8.1, 0.327
<i>Sall</i>	1.2, 2.8, 3.7	90	0.954, 1.2, 1.5, 4.7	4.2, 1.7, 0.954, 1.5
<i>HindIII</i>	3.4, 3.8	No corta	0.418, 5	0.418, 5
<i>EcoRI</i>	No corta	70, 52	3, 5.4	3, 5.4

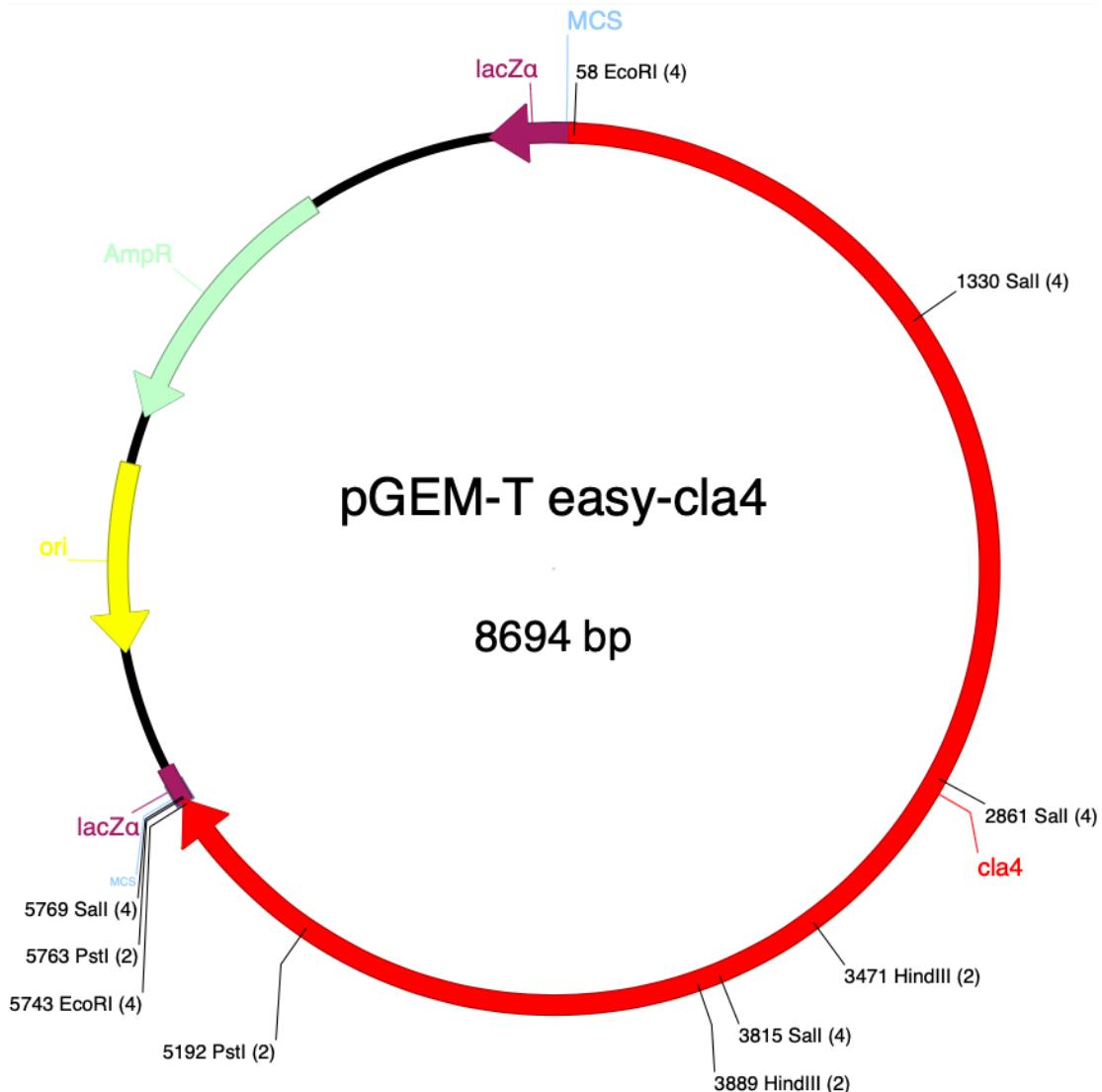


Figura 21. Vector de clonación pGEM-T easy con *cla4*. Este plásmido contiene clonado el gen *cla4*; AmpR, gen de resistencia a ampicilina; ori, origen de replicación; MCS, sitio de múltiple clonación; LacZ, codifica para la β -galactosidasa. Plásmido diseñado en el programa ApE- A plasmid Editor v3.0.9.

10.6.2 Clonación de *cla4* en pBC-NTC

Para construir el plásmido pBC-NTC-*cla4*, el gen *cla4* se liberó mediante una restricción con *EcoRI* del plásmido pGEM-T easy-*cla4*-15 y el plásmido pBC-NTC se linealizó con la misma enzima. Los fragmentos (*cla4* y pBC-NTC) se ligaron y se transformó *E. coli*.

Se obtuvo únicamente una colonia blanca resistente a cloranfenicol, la cual fue analizada mediante un patrón de restricción con las endonucleasas *EcoRI*, *EcoRV*, *Clal*, *HindIII*, *SacI*, *SacII*, *Sall* y *Xhol* (Figura 22) (Tabla 9). De acuerdo con las bandas que se generaron, si corresponden al patrón de restricción esperado, indicando que el plásmido pBC-NTC si porta el gen *cla4* en dirección sentido al gen *lacZ* (Figura 23). Con el plásmido pBC-NTC que porta el gen *cla4* se transformó una cepa mutante Δ *cla4*, obteniendo crecimiento en el control negativo sin plásmido similar a la transformación donde se incluyó el plásmido. El experimento se repitió incrementando la concentración a 200 μ g/mL de NTC e higromicina B, pero los resultados fueron similares. Dado esta problemática y el costo del antibiótico se decidió continuar con la caracterización del alelo *tub2* resistente a benomilo.

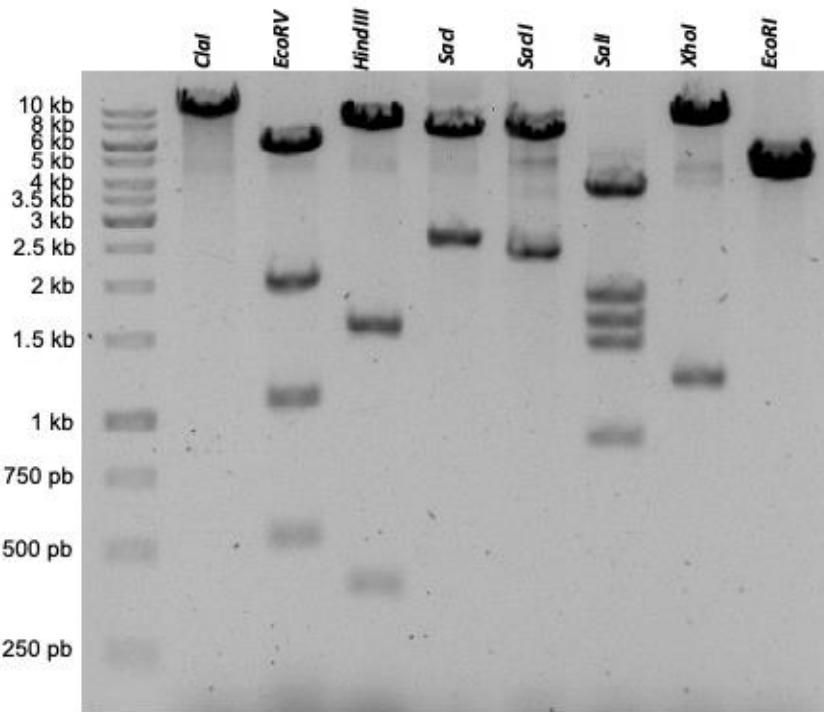


Figura 22. Patrón de restricción de pBC-NTC-*cla4*. En el análisis por restricción se utilizaron las endonucleasas que se mencionan en la figura. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

Tabla 9. Patrón de restricción del plásmido pBC-NTC-cla4. Se muestran los sitios de corte en el gen y el vector de cada endonucleasa; así como las bandas esperadas.

Enzima	Sitios de corte en gen (kb)	Sitio de corte en el vector (pb)	Bandas esperadas (kb) →	Bandas esperadas (kb) ←
<i>EcoRI</i>	No corta	701	4.8, 5.4	4.8, 5.4
<i>EcoRV</i>	1.4, 3.5, 4.1, 4.3	697	0.2, 0.5, 1.1, 2.1, 6.3	0.2, 0.5, 1.5, 2.1, 5.9
<i>Clal</i>	2.4	684	10.2	10.2
<i>HindIII</i>	3.4, 3.8	689	0.4, 1.6, 8.2	0.4, 3.4, 6.4
<i>SacI</i>	2.6	759	2.6, 7.6	2.8, 7.4
<i>SacII</i>	0.112, 2.6	750	0.1, 2.5, 7.6	2.5, 2.8, 4.9
<i>Sall</i>	1.2, 2.8, 3.7	674	1, 1.5, 1.7, 6	1, 1.3, 1.5, 6.5
<i>Xhol</i>	4.2	668	1.2, 9	4.2, 6

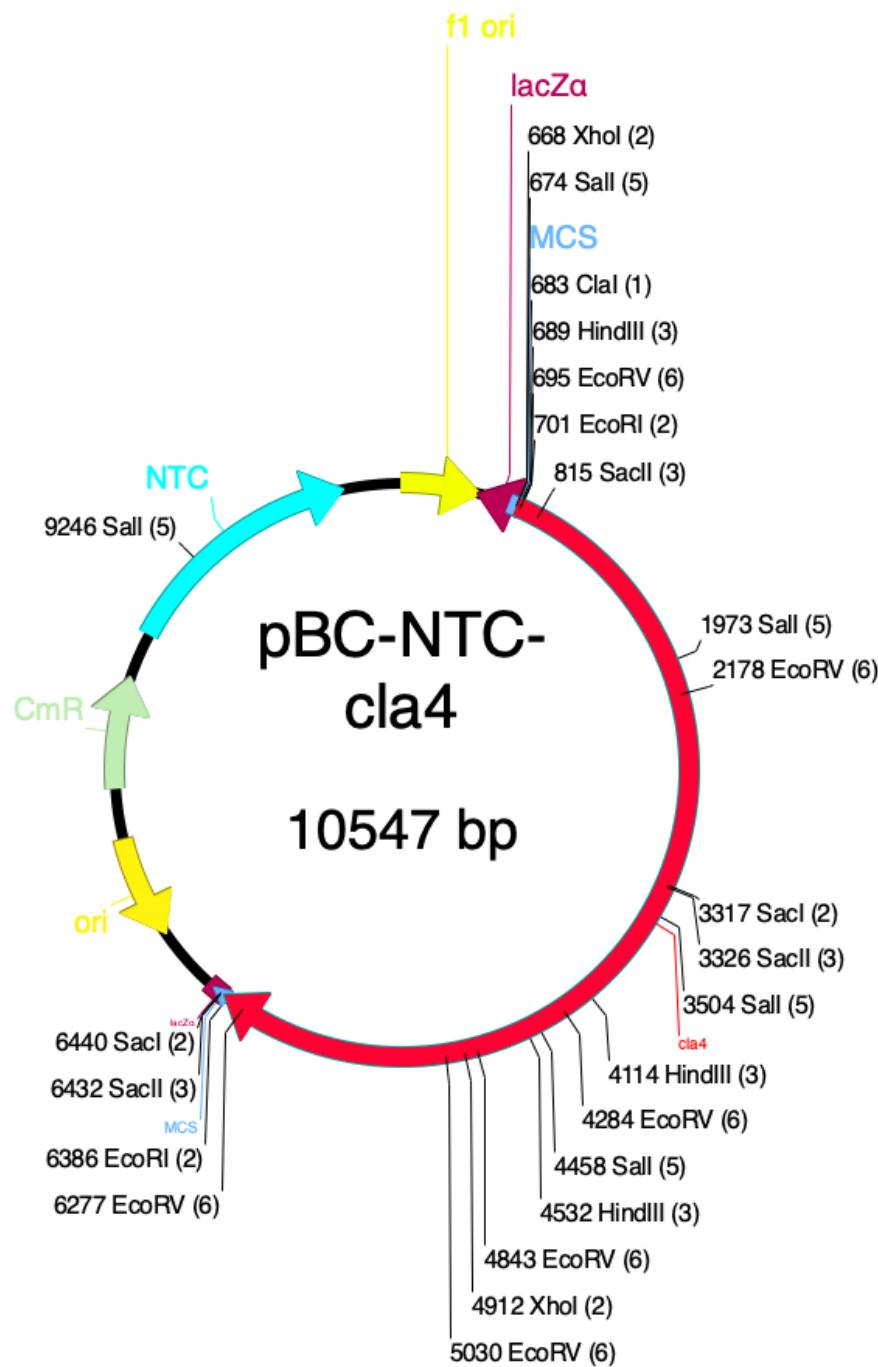


Figura 23. Plásmido pBC-NTC-cla4. Este plásmido contiene el gen *cla4*; gen *nat1* que codifica la nourseotricina acetil transferasa; CmR, gen de resistencia a cloranfenicol; ori, origen de replicación; MCS, sitio de múltiple clonación; LacZ, codifica para la β -galactosidasa; f1 Ori, origen de replicación del bacteriófago f1. Plásmido diseñado en el programa ApE- A plasmid Editor v3.0.9.

10.7 Construcción del plásmido pGEM-tub2 con resistencia a benomilo

10.7.1 Mutagénesis del gen *tub2*

La mayoría de los hongos tienen dos genes que codifican para beta-tubulina (*tub1* y *tub2*) y uno que codifica para la alfa-tubulina, ambas son importantes para la formación de microtúbulos. En *T. atroviride* se identificó una mutación puntual en el gen *tub2* que confiere resistencia a benomilo, provocando un cambio de una His por una Tyr en la posición 6 (Goldman et al., 1993). Para realizar la mutación del gen *tub2* de *T. atroviride*, se diseñaron oligonucleótidos para generar la mutación del gen y se utilizó la técnica de PCR doble unión como se indica en el apartado de metodología. Usando oligonucleótidos específicos, en el primer paso se amplificaron 740 pb (Ptub2-F y BRtub2-R), y 1.7 Kb (BRtub2-F y Ttub2-R) (Figura 24A). En el segundo paso, se fusionaron los dos fragmentos para obtener *tub2c* con la mutación. Finalmente, en el tercer paso se amplificó una banda de 2.2 Kb que corresponde al tamaño teórico usando los oligonucleótidos anidados (N5tub2-F y N3tub2-R), aumentando así la concentración y especificidad del gen (Figura 24B).

Por otro lado, en la amplificación del gen *tub2* sin promotor (*tub2t*) se obtuvo una secuencia de 1.6 Kb (BRtub2-F y N3tub2-R) (Figura 24B).

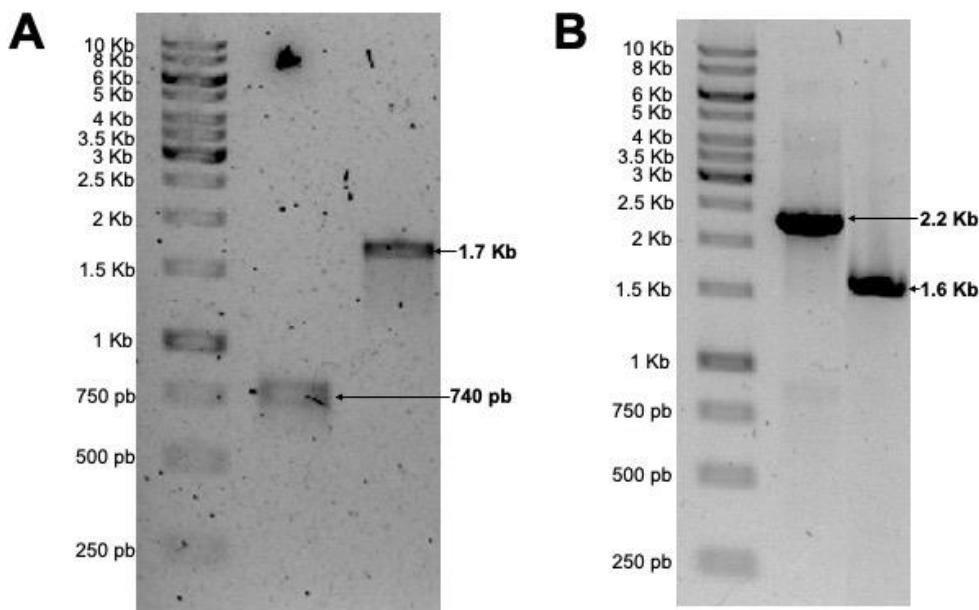


Figura 24. Generación del alelo del gen *tub2* con la mutación que confiere resistencia a benomilo. A. PCR1. Bandas amplificadas usando los cebadores Ptub2-F y BRtub2-R de 740 pb; y BRtub2-F y Ttub2-R de 1.7 Kb. **B. PCR3.** Amplicón del gen *tub2* con la mutación usando los cebadores N5tub2-F y N3tub2-R de 2.2 Kb (fragmentos fusionados del PCR2); y amplicón del gen *tub2* usando los cebadores BRtub2-F y N3tub2-R de 1.6 Kb. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

10.7.2 Clonación de *tub2c* y *tub2t* en el plásmido pGEM-T easy

El gen *tub2* con la mutación en sus dos versiones (*tub2c* y *tub2t*) se clonaron en el plásmido comercial pGEM-T easy (Promega).

Para identificar plásmidos recombinantes, se obtuvieron minipreparaciones de ADN plasmídico de colonias blancas resistentes a ampicilina. En la primera aproximación, se realizaron restricciones con la endonucleasa *EcoRI*, cortando en ambos lados del sitio de clonación del vector y el gen en la posición 1239 para pGEM-*tub2c* y en la 592 para pGEM-*tub2t*. Por lo tanto, el plásmido que porta *tub2c* o *tub2t* debe mostrar 3 bandas. En el caso de pGEM-*tub2c* se esperan 1) 1.2 Kb; 2) 1 Kb; y 3) 3 Kb. Mientras que para pGEM-*tub2t* se esperan 1) 592 pb; 2) 1 Kb; y 3) 3 Kb.

Los plásmidos pGEM-tub2c 1, 4, 5, 6 y 7 (Figura 25A), y los plásmidos pGEM-tub2t 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 y 12 (Figura 27) mostraron el patrón de bandas esperado para *EcoRI*. A partir de los 5 plásmidos positivos de pGEM-tub2c se les realizó un patrón de restricción con las endonucleasas *EcoRV*, *PstI*, *SacII* y *Xhol* (Figura 25B) (Tabla 10). Mientras que para los plásmidos pGEM-tub2t 10, 11 y 12 se les realizó un patrón de restricción con las endonucleasas *BamHI*, *Sall* y *Xhol* (Tabla 11). El patrón de restricción de pGEM-tub2c y pGEM-tub2t coinciden con las bandas esperadas. Se purificaron los plásmidos pGEM-tub2c 1 y 4, donde el 1 presenta una orientación sentido (Figura 26A) y el 4 orientación antisentido, tomando como referencia el gen *LacZ* (Figura 26B).

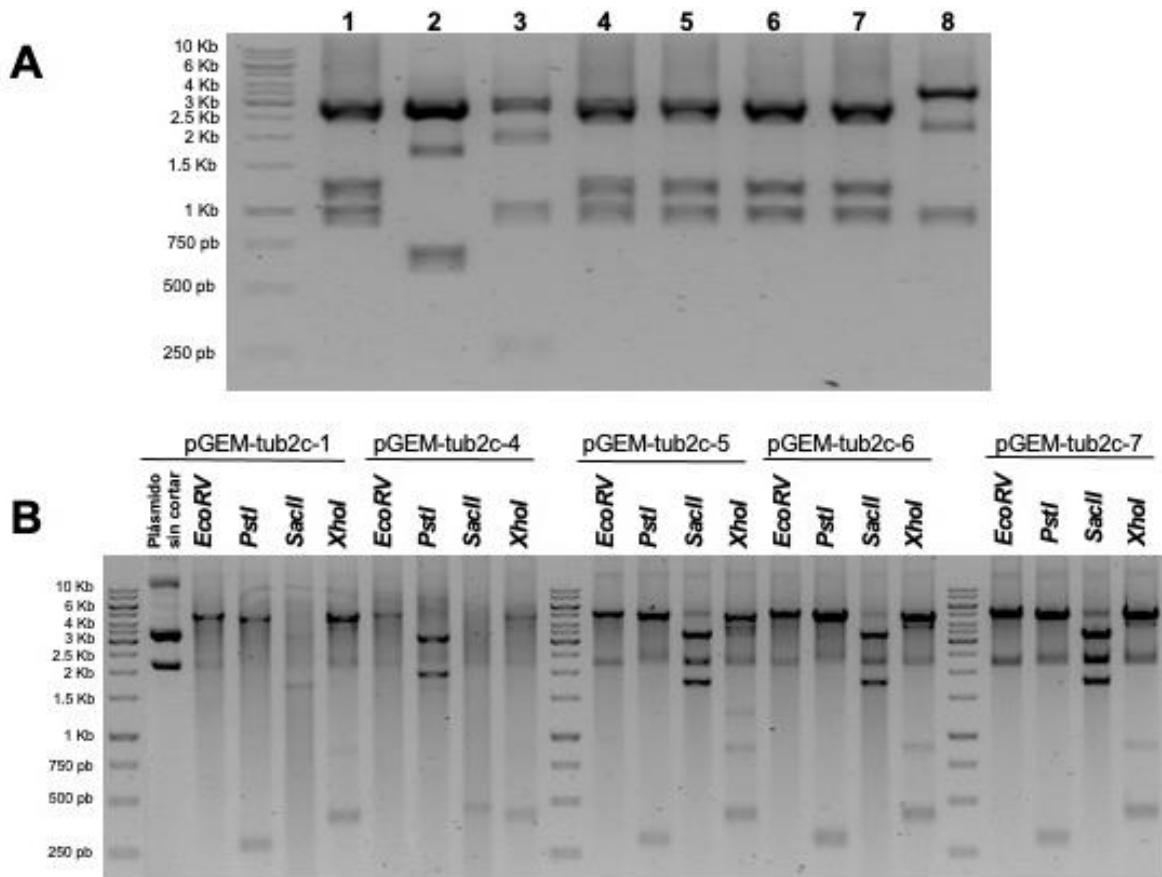


Figura 25. Clonación del gen *tub2c*. **A.** Identificación por restricción con *EcoRI* del plásmido pGEM-tub2c. **B.** Patrón de restricción de los plásmidos pGEM-tub2c 1, 4, 5 ,6 y 7 utilizando las endonucleasas que se mencionan en la figura. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

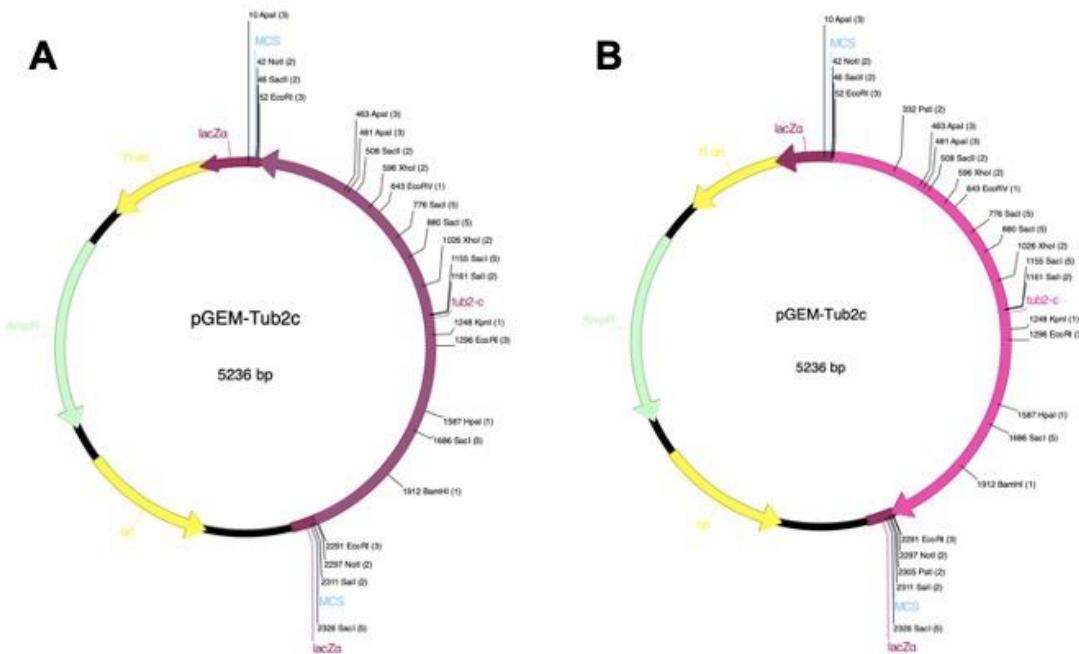


Figura 26. Plásmido pGEM-tub2c. Este plásmido contiene clonado el alelo del gen *tub2* con resistencia a benomilo; AmpR, gen de resistencia a ampicilina; ori, origen de replicación; MCS, sitio de múltiple clonación; LacZ, codifica para la β -galactosidasa. Plásmido diseñado en el programa ApE- A plasmid Editor v3.0.9. **A.** Plásmido con el gen *tub2* dirección sentido. **B.** Plásmido con el gen *tub2* antisentido.

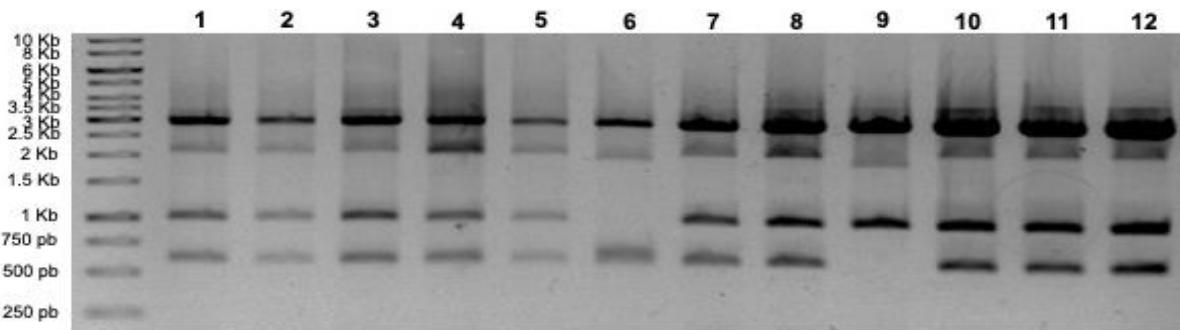


Figura 27. Clonación del gen *tub2t*. Identificación por restricción con *EcoRI* del plásmido pGEM-tub2t. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

Tabla 10. Patrón de restricción del plásmido pGEM-tub2c. Se muestran los sitios de corte en el gen y el vector de cada endonucleasa; así como las bandas esperadas.

Enzima	Sitios de corte en gen (kb)	Sitio de corte en el vector (pb)	Bandas esperadas (kb) →	Bandas esperadas (kb) ←
<i>EcoRI</i>	1.2	52, 70	1, 1.2, 3	1, 1.2, 3
<i>BamHI</i>	1.8	No corta	5.2	5.2
<i>EcoRV</i>	0.5	No corta	5.2	5.2
<i>HpaI</i>	1.5	No corta	5.2	5.2
<i>KpnI</i>	1.2	No corta	5.2	5.2
<i>PstI</i>	0.3	88	0.3, 4.9	1.9, 3.3
<i>SacI</i>	0.7, 0.8, 1.1, 1.6	109	0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 3.6	0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 3.7
<i>SacII</i>	0.4	49	1.7, 3.4	0.4, 4.8
<i>Sall</i>	1.1	90	1.1, 4.1	1.1, 4.1
<i>Xhol</i>	0.5, 0.9	No corta	0.4, 4.8	0.4, 4.8

Tabla 11. Patrón de restricción del plásmido pGEM-tub2t. Se muestran los sitios de corte en el gen y el vector de cada endonucleasa; así como las bandas esperadas.

Enzima	Sitios de corte en gen (pb)	Sitio de corte en el vector (pb)	Bandas esperadas (kb) →	Bandas esperadas (kb) ←
<i>EcoRI</i>	592	52, 70	0.6, 1, 3	0.6, 1, 3
<i>BamHI</i>	1215	No corta	4.6	4.6
<i>HpaI</i>	892	No corta	4.6	4.6
<i>KpnI</i>	555	No corta	4.6	4.6
<i>SacI</i>	83, 187, 462, 993	109	0.08, 0.1, 0.3, 0.5, 3.6	0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 3.1
<i>Sall</i>	464	90	0.4, 4.1	1.1, 3.4
<i>Xhol</i>	329	No corta	3.6	3.6

10.7.3 Tub2c-1p y Tub2c-4s

Se eligieron los plásmidos pGEM-tub2c 1 y 4, los cuales fueron los plásmidos más limpios y de mayor concentración, además de que presentan orientación sentido y antisentido respectivamente. Estos fueron digeridos con las enzimas *PstI* el plásmido 1 y con *SacII* el plásmido 4, liberando fragmentos de 279pb y 454pb, respectivamente. Se obtuvieron secuencias más cortas de la región promotora del gen *tub2*; siendo de 1,959pb para tub2c-1p y 1,783pb para tub2c-4s; por lo tanto, plásmidos más pequeños (Figura 28A). En el análisis por restricción con *EcoRI* de los seis plásmidos analizados, todos dieron el patrón de bandas esperado para cada plásmido. Sin embargo, en todos los carriles, excepto en el

carril 16, se observa una banda de fondo de aproximadamente 2.4 Kb y 2.2 Kb; las cuales probablemente representan plásmido sin cortar, debido a que coinciden con una de las bandas del plásmido sin cortar (Figura 28 B).

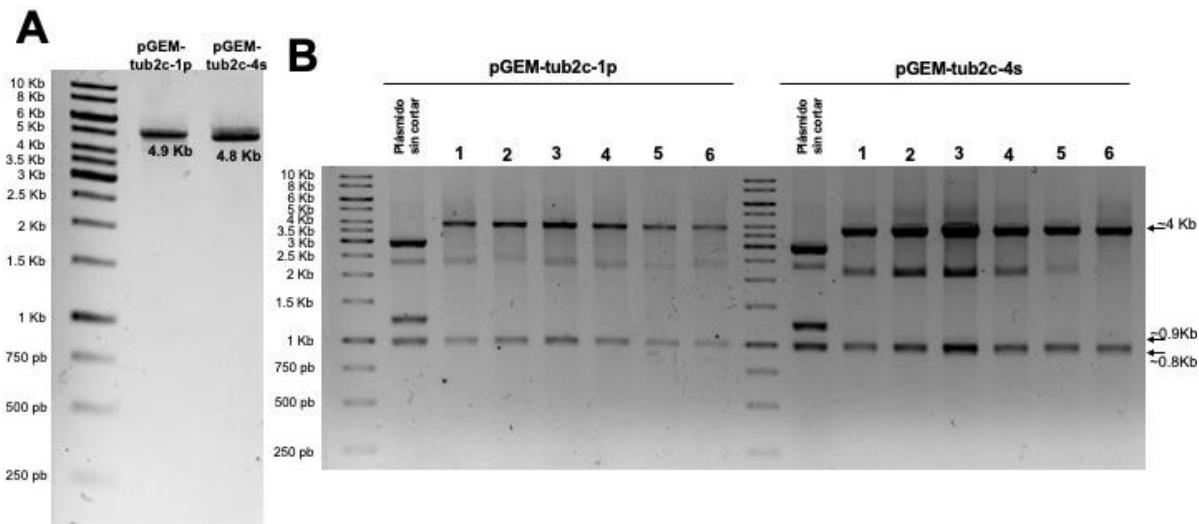


Figura 28. Plásmidos pGEM-tub2c-1p y pGEM-tub2c-4s. **A.** Plásmidos cortados con las enzimas *PstI* y *SacII*. pGEM-tub2c-1s de 4.9 Kb y pGEM-tub2c-4s de 4.8 Kb. **B.** Identificación por restricción con *EcoRI* de los plásmidos pGEM-tub2c-1p y 4s. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

10.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de benomilo

Para poder seleccionar transformantes de *T. atroviride* con el plásmido pGEM-tub2 se realizó un ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria. Se inocularon las cepas silvestres *T. atroviride* y *T. asperellum* en diferentes concentraciones de benomilo. En la concentración de 1 µg/mL de benomilo se ve afectado el crecimiento de *T. asperellum*, mientras que *T. atroviride* fue inhibido totalmente (Figura 29). Por lo tanto, se consideró la concentración de 2 µg/mL para seleccionar colonias transformadas resistentes a benomilo.

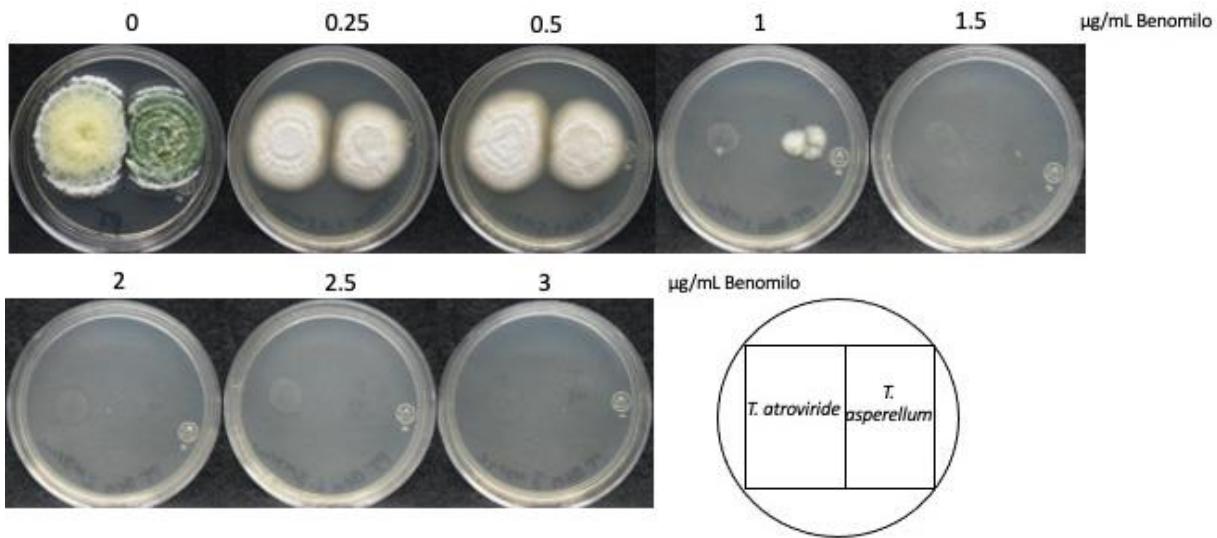


Figura 29. Concentración mínima inhibitoria de benomilo. Se utilizó medio PDA y se colocaron gotas de 5 µL con 10 millones de esporas/mL. Se incubaron a 27°C durante 7 días. Abajo se muestra la plantilla que indica el nombre de la cepa cada gota.

10.9 Transformación de *T. atroviride* con pGEM-tub2c

Para determinar la funcionalidad de los plásmidos y su resistencia a benomilo, se transformó *T. atroviride* con todos los plásmidos que portan las diferentes versiones de *tub2*. Las transformantes fueron seleccionadas por resistencia al antifúngico benomilo. En el control negativo donde en lugar de usar el plásmido se usó solución osmótica, no hubo crecimiento, comprobando que las colonias que se desarrollaron eran únicamente cepas transformantes. Se obtuvieron un total de 9 transformantes resistentes a benomilo (Figura 30), utilizando el plásmido pGEM-tub2c-4. Sin embargo, después de realizar tres cultivos monospóricos se obtuvieron únicamente 6 transformantes estables. Para el caso de las versiones más pequeñas pGEM-tub2t, pGEM-Tub2c-1p y pGEM-Tub2c-4s, no se logró obtener colonias transformantes, sugiriendo que estas versiones no tienen un promotor funcional y se requiere para conferir la resistencia al benomilo. Por lo tanto, los plásmidos no funcionales fueron descartados y se siguió trabajando únicamente con el plásmido con la construcción completa.

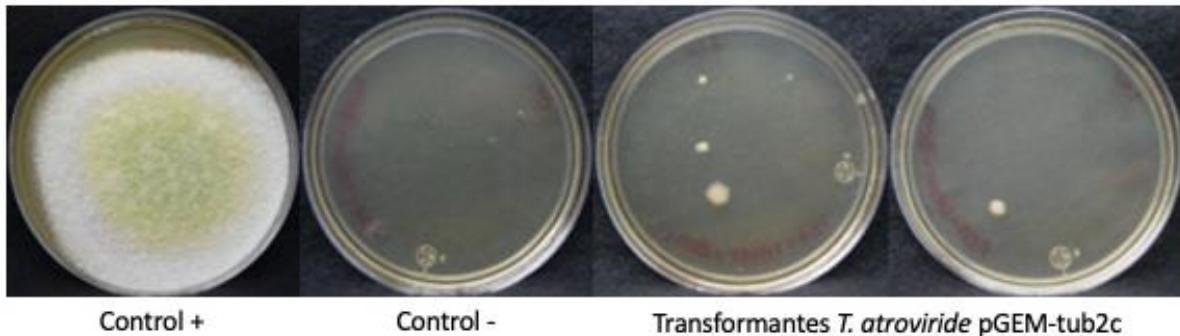


Figura 30. **Transformantes de *T. atroviride* resistentes a benomilo.** Control positivo, los protoplastos se inocularon en PDA + 1M de sorbitol sin antifúngico, para observar la viabilidad al final de la manipulación. Control negativo, los protoplastos sometidos al mismo proceso de transformación sin plásmido, cultivados en medio selectivo (PDA +1 M sorbitol + benomilo 2 µg/mL). Transformantes, los protoplastos transformados con pGEM-tub2c y cultivados en medio selectivo. Los cultivos se incubaron a 27°C durante 6 días.

10.9.1 Estabilidad de transformantes resistentes a benomilo

Se analizaron dos colonias transformantes, a las cuales se les realizaron tres pasos monospóricos. Posteriormente, al realizarles una prueba de estabilidad a las transformantes del tercer paso monospórico, estas crecieron en PDA con y sin selección; sin embargo, el crecimiento de las cepas transformantes fue más lento y deficiente en presencia de benomilo (Figura 31), indicando que de las dos colonias analizadas solo algunas esporas mantienen el plásmido integrado.

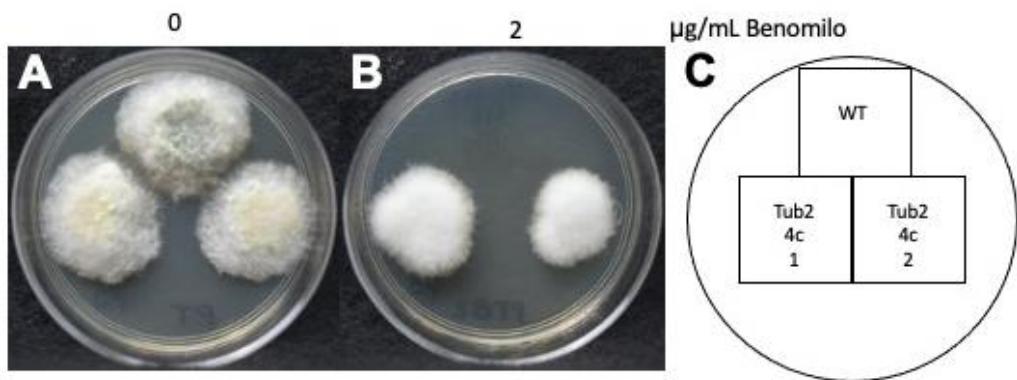


Figura 31. Prueba de estabilidad de transformantes resistentes a benomilo. A. Medio PDA sin selección. **B.** Medio PDA adicionado con 2 µg/mL de benomilo. **C.** Plantilla con el nombre de cada cepa. Se incubaron a 37°C durante 4 días.

10.10 Ensayo de segregación del alelo *tub2* resistente a benomilo

Para determinar el porcentaje de esporas que portan el alelo *tub2* resistente a benomilo, se analizó la segregación, determinando el porcentaje de esporas resistentes a benomilo. Debido a que las transformantes presentaron una producción de esporas muy limitado, el análisis se realizó solo con esporas generadas sin selección. Inesperadamente, el porcentaje de esporas resistentes a benomilo fue muy bajo, *Tub2-4c-1* tuvo un 5.6% y *Tub2-4c-2* un 0.9% de esporas resistentes a benomilo. Estos resultados tienen al menos dos interpretaciones, la primera sugiere que las transformantes son heterocariontes que poseen una baja proporción de núcleos transformados y un alto porcentaje de núcleos no transformados o silvestres. La segunda interpretación sugiere que *tub1* y *tub2* tienen funciones diferentes, específicas de desarrollo. Considerando que las transformantes producen muy pocas esporas en presencia de benomilo, sugiere que *tub1* tiene funciones más importantes en esporulación y germinación, mientras que *tub2* tiene funciones específicas en otros estadios de desarrollo.

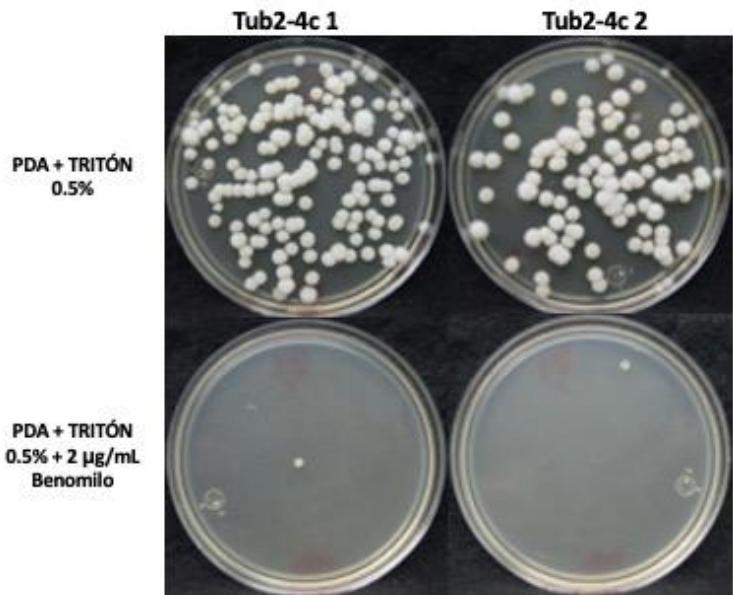


Figura 32. Análisis de segregación de la resistencia a benomilo. A. Esporas crecidas previamente en PDA sin selección. B. Esporas crecidas previamente en PDA con selección. En cada foto se tiene el número de colonias por placa.

10.11 Identificación del alelo mutante *tub2* en transformantes de *T. atroviride* resistentes a benomilo

Con el propósito de determinar la presencia del alelo *tub2* resistente a benomilo en las transformantes, se utilizó el ADNg de las dos transformantes estables seleccionadas y se amplificó el marcador de selección, gen *tub2* resistente a benomilo. Como control negativo se utilizó el ADNg de la cepa silvestre, y como control positivo el plásmido pGEM-*tub2c*. Posteriormente, debido a que el tamaño del alelo silvestre y el mutante es diferente únicamente por 207 pb, la diferencia entre una banda correspondiente a *tub2* silvestre y mutante es muy sutil (Figura 33A), pero claramente se observó una pequeña diferencia en la movilidad electroforética en la banda de las transformantes que se parece a la banda detectada en el plásmido pBC-NTC, pero diferente a la detectada en la cepa silvestre. Para aclarar más este resultado, se realizó una restricción de los amplicones con la endonucleasa *Xhol*. La endonucleasa *Xhol* tiene dos sitios de corte en el gen *tub2*, donde en el alelo silvestre corta en las posiciones 539 y 1176; mientras que en el alelo mutante corta en 539 y 969. Por lo tanto, se esperarían para el silvestre una banda de 539 pb, 637 pb y 1.2 Kb;

mientras que en el mutante una banda de 539 pb, 430 pb y 1.2 Kb. Como se observa en la figura 33B, tanto en las cepas crecidas previamente en medio con selección como en las crecidas con selección, muestran el mismo patrón de bandas que el alelo *tub2* mutante, indicando que la integración de *tub2* resistente a benomilo ocurrió por recombinación homóloga. Además, este análisis molecular muestra evidencia de que las cepas transformantes solo portan núcleos transformados, y no mezcla de núcleos silvestres y transformados, perfil típico esperado para un heterocarionte, como sugiere el análisis de segregación.

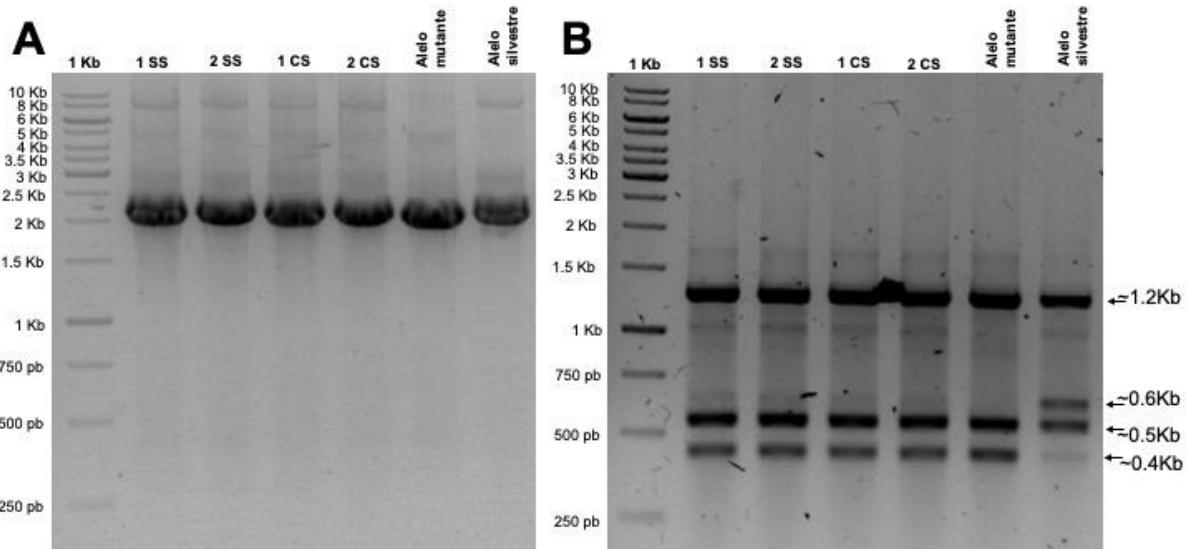


Figura 33. Identificación del alelo mutante *tub2* resistente a benomilo. A. Amplificación del gen *tub2* del ADN extraído de las cepas *tub2-4c* 1 y 2, del plásmido construido pGEM-*tub2c* y de la cepa silvestre de *T. atroviride*; con los oligonucleótidos N5*tub2*-F y N3*tub2*-R. B. Restricciones con *Xhol* de los amplicones. SS; sin selección, CS; con selección. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

10.12 Construcción del plásmido pGEM-sdh con resistencia a carboxina

10.12.1 Mutagénesis sitio dirigida del gen *sdh*

La carboxina es utilizada para el control de hongos fitopatógenos. Este antifúngico inhibe la enzima succinato deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico y parte del complejo II

del transporte de electrones en la fosforilación oxidativa. Alelos del gen *sdh* resistentes a carboxina presentan un cambio en una histidina (CAC) por una leucina (CTC) en el codón 246 del gen *sdh*. Para realizar la mutación del gen *sdh* de *T. atroviride*, se diseñaron oligonucleótidos para generar la mutación del gen y se utilizó la técnica de PCR doble unión como se indica en el apartado de metodología. Usando oligonucleótidos específicos, en el primer paso se amplificaron por PCR dos fragmentos 983 pb (Psdh-F y CRsdh-R) y 480 pb (CRsdh-F y Tsdh-R) (Figura 34A). En el segundo paso, se fusionaron los dos fragmentos obtenidos para construir el gen *sdh* con la mutación. Finalmente, en el tercer paso se amplificó una banda de 1.3 Kb que corresponde al tamaño teórico usando los oligonucleótidos anidados (N5sdh-F y N3sdh-R), aumentando así la concentración y especificidad del gen (Figura 34B).

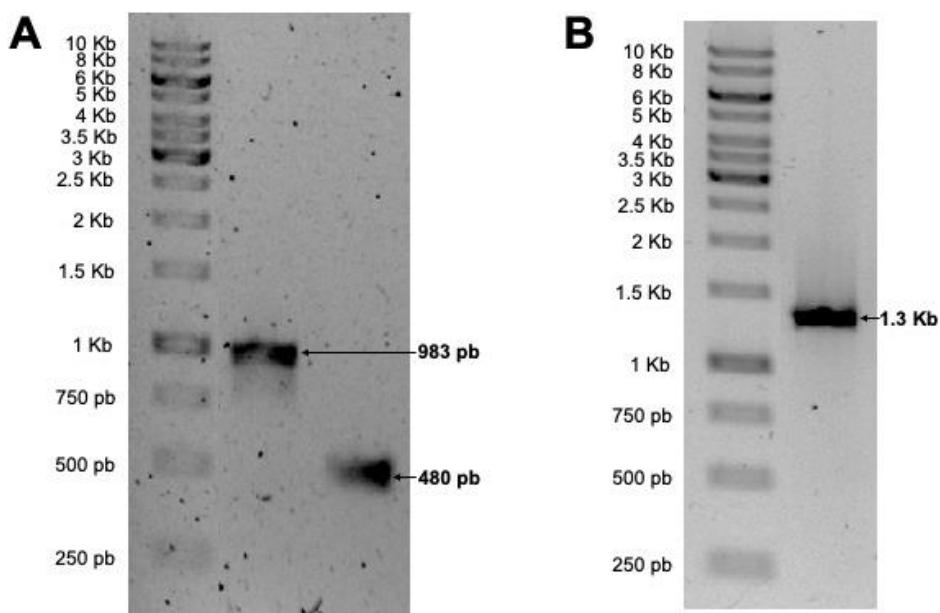


Figura 34. Construcción del alelo del gen *sdh* resistente a carboxina. A. PCR1. Bandas amplificadas usando los cebadores Psdh-F y CRsdh-R de 983pb; y CRsdh-F y Tsdh-R de 480pb. **B. PCR3.** Amplicón del gen *sdh* con la mutación usando los cebadores N5sdh-F y N3sdh-R de 1.3 Kb (fragmentos fusionados del PCR2. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

10.13 Clonación de *sdh* en pGEM-T easy

El gen *sdh* con la mutación se clonó en el plásmido comercial pGEM-T easy (Promega). Para identificar plásmidos recombinantes, primero se realizaron restricciones con la endonucleasa *EcoRI*, cortando en ambos lados del sitio de clonación del vector y el gen en la posición 791 pb. Por lo tanto, el plásmido que porta *sdh* debe mostrar 3 bandas; 1) 3 Kb; 2) 791 pb; y 3) 530 pb. Los 24 plásmidos analizados con *EcoRI* dieron positivos al patrón de bandas esperado (Figura 35A). Sin embargo, se eligieron los plásmidos 8, 10 y 15 los cuales muestran patrones de bandas más limpios y concentraciones más altas. A partir de estos 3 plásmidos se les realizó un patrón de restricción con las endonucleasas *PstI*, *XhoI* y *BamHI* (Figura 35B) (Tabla 12). El patrón de restricción de pGEM-*sdh* coincide con las bandas esperadas, indicando que la orientación del gen *sdh* quedó como se observa en la figura 36.

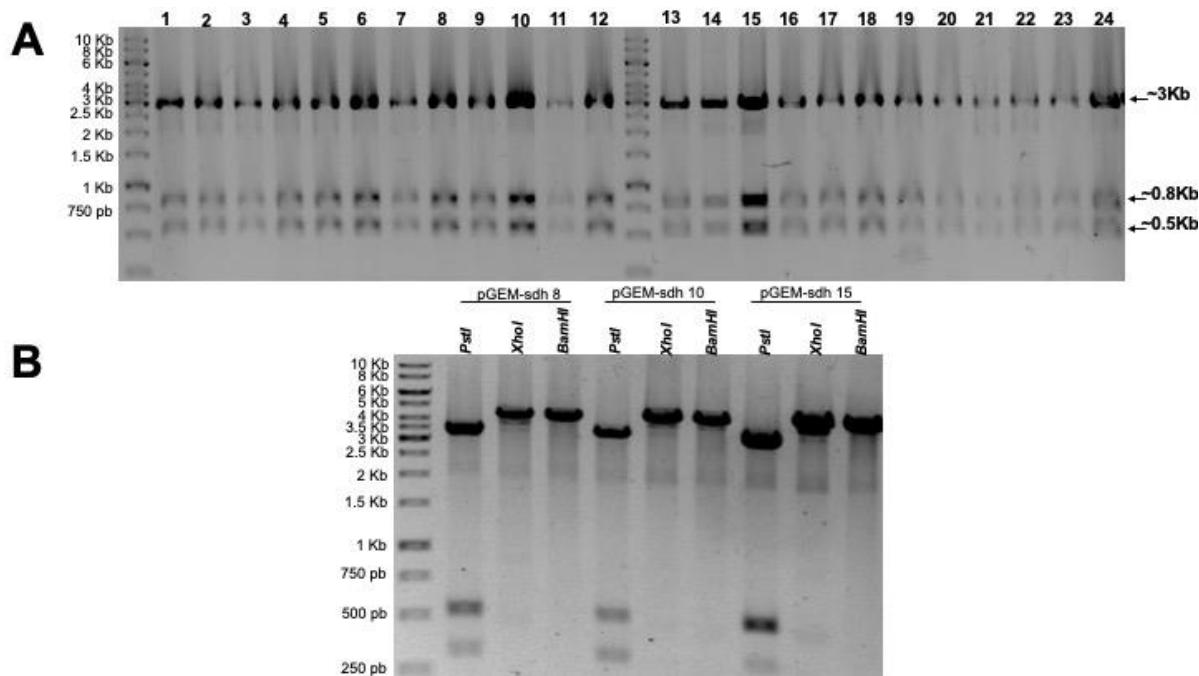


Figura 35. Clonación del gen *sdh* en el plásmido pGEM-t easy. A. Identificación por restricción con *EcoRI* del plásmido pGEM-*sdh*. **B.** Patrón de restricción de los plásmidos pGEM-*sdh* 8, 10 y 15 utilizando las enzimas que se mencionan en la figura. Para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

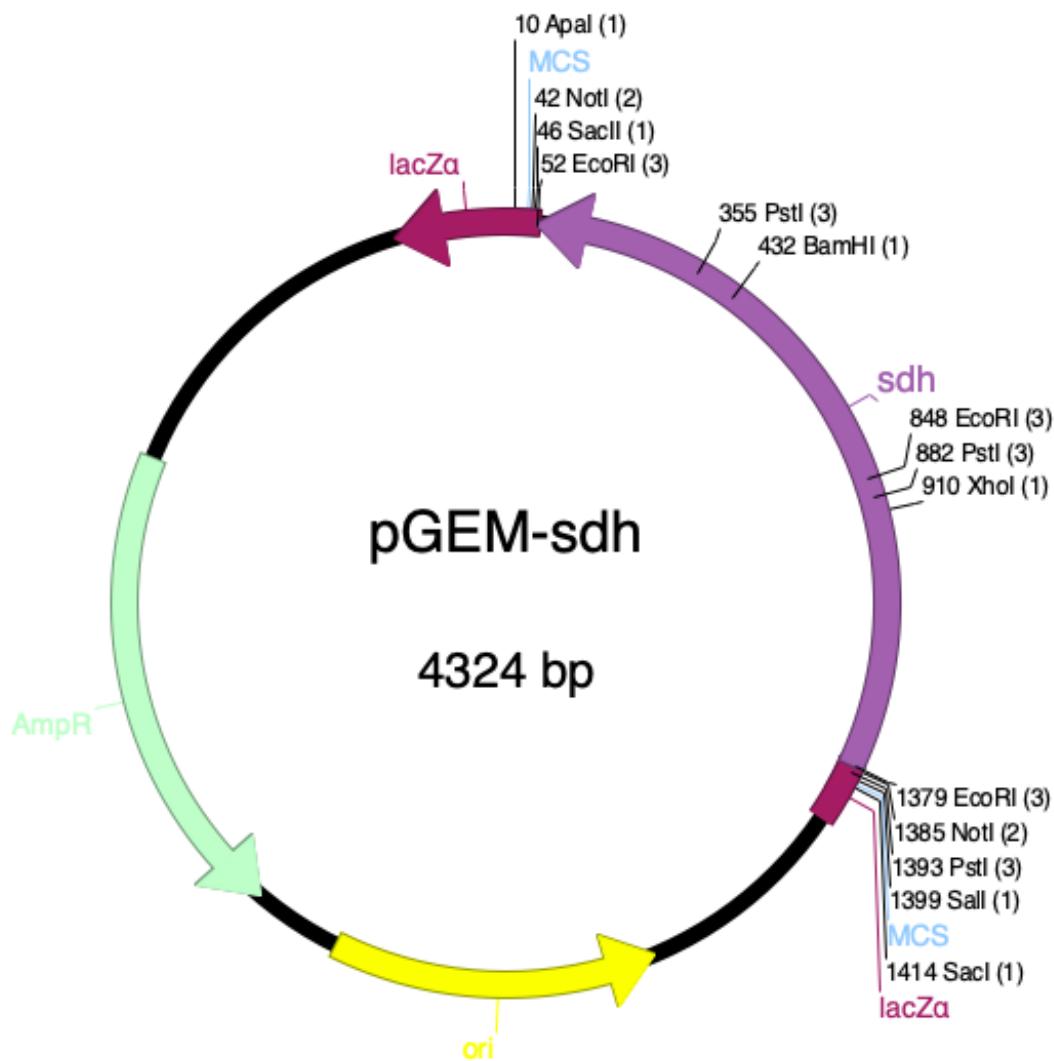


Figura 36. Plásmido pGEM-sdh. Este plásmido contiene clonado el alelo del gen *sdh* resistente a carboxina; AmpR, gen de resistencia a ampicilina; ori, origen de replicación; MCS, sitio de múltiple clonación; LacZ, codifica para la β-galactosidasa. Plásmido diseñado en el programa ApE- A plasmid Editor v3.0.9.

Tabla 12. Patrón de restricción del plásmido pGEM-sdh. Se muestran los sitios de corte en el gen y el vector de cada endonucleasa; así como las bandas esperadas.

Enzima	Sitios de corte en gen (pb)	Sitio de corte en el vector (pb)	Bandas esperadas (kb) →	Bandas esperadas (kb) ←
<i>EcoRI</i>	791	52, 70	0.5, 0.8, 3	0.5, 0.8, 3
<i>PstI</i>	302, 829	88	0.3, 0.5, 3.5	0.5, 0.5, 3.3
<i>Xhol</i>	853	No corta	4.3	4.3
<i>BamHI</i>	375	No corta	4.3	4.3

10.13.1 Transformación de *T. atroviride* con pGEM-sdh

Para determinar la funcionalidad de los plásmidos y su resistencia a carboxina, se transformó *T. atroviride* con el plásmido pGEM-sdh 8. Sin embargo, después de dos intentos de transformación no se logró obtener ninguna colonia transformante. Este resultado sugiere que los marcadores de selección deben tener un promotor completo para ser funcionales y brindar resistencia a este antifúngico en *Trichoderma* y se suman a los resultados obtenidos con las versiones cortas del gen *tub2* resistente a benomilo que fueron incapaces de proporcionar resistencia a benomilo.

11 DISCUSIÓN

La higromicina B es uno de los marcadores de selección más comunes y utilizados en los estudios de transformación genética de *Trichoderma spp.* para la generación de mutantes, sobre expresión de genes y estudios de la localización de proteínas etiquetadas con reporteros fluorescentes. Sin embargo, el desarrollo e implementación de nuevos marcadores de resistencia es necesario para el estudio de genes de los hongos filamentosos, permitiendo la delección simultánea de más de un gen, complementación de genes en fondos genéticos mutantes y el múltiple etiquetado de proteínas con diferentes reporteros fluorescentes. Por lo tanto, en este trabajo se realizaron tres nuevos vectores basados en la resistencia a nourseotricina, benomilo y carboxina.

Marcador seleccionable a la nourseotricina en *Trichoderma atroviride*

La nourseotricina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro de estreptotricina. Este antibiótico actúa inhibiendo la síntesis de proteínas al provocar errores de codificación. La resistencia a la nourseotricina se da mediante una N-acetyltransferasa que es codificada por el gen *nat1* (nourseotricina acetiltransferasa 1) de *Streptomyces noursei*. El marcador de selección *nat1* se ha utilizado ampliamente para la manipulación genética de levaduras como *S. cerevisiae*, bacterias como *B. pseudomallei* y *Francisella tularensis* (Lehman et al., 2016). La transformación genética de *T. atroviride* con el vector pCB-NTC fue muy eficiente; sin embargo, las transformantes fueron inestables, manteniendo el vector y resistencia a NTC bajo condiciones de selección y rápidamente perdiéndolo en la primera generación de esporas sin selección. Esto fue demostrado mediante la prueba de PCR para la identificación del plásmido, observando que al momento de quitarles la selección pierden el plásmido, debido a que no se logró amplificar la banda de *nat1*. Estos resultados son consistentes con la inestabilidad de transformantes previamente reportada usando el vector pCB1004 que porta el gen *hph* que confiere resistencia a higromicina B (Herrera-Estrella et al., 1990; Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2020). Las transformantes que portaban el plásmido pCB1004 perdían el plásmido en la primera generación de conidios producidos sin presión selectiva, perdiendo la resistencia y consecuentemente el plásmido pCB1004. Mediante experimentos de recuperación de plásmido en *Escherichia coli* se demostró que *T. atroviride* propaga los plásmidos por replicación autónoma solo bajo presión selectiva. Estos resultados indican que el plásmido pBC-NTC es autorreplicativo y una herramienta importante para futuros trabajos de expresión transitoria de genes en *Trichoderma*.

Considerando que secuencias homologas al genoma de *T. atroviride* promueve la incorporación del vector por recombinación homóloga (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2020), se intentó hacer la complementación de mutantes carentes en los genes *nik1* o *cla4* de *T. atroviride* con este vector, sin embargo, se presentó mucho fondo en el control negativo similar a la transformación con los plásmidos que portaban el gen *nik1* y *cla4*. Aunque se realizaron varios intentos, no se logró obtener transformantes con la complementación de ambos genes en sus respectivos fondos mutantes. Dado que siempre se obtuvo crecimiento en el control negativo, una posibilidad es que el gen *hph* que confiere resistencia a higromicina B presente resistencia cruzada a nourseotricina. Cabe destacar que, el fondo en el control negativo fue muy inferior al control de viabilidad, sugiriendo que los fenotipos de las cepas mutantes pueden también complicar los experimentos de complementación de fondos genéticos mutantes en *T. atroviride*, pero más investigación es necesario para aclarar esa problemática. Aunque no se tuvo éxito para la complementación de mutantes, el marcador *nat1* de resistencia a nourseotricina parece prometedor para análisis funcional de genes mediante reemplazos génicos (“knock out”) en cepas silvestres de *Trichoderma*.

Marcador seleccionable a benomilo en *Trichoderma atroviride*

El benomilo es un agente antimitótico que interfiere con la polimerización de beta-tubulina y formación de microtúbulos. La resistencia al benomilo ha sido descrita como una alteración en la proteína β-tubulina que disminuye la unión del fungicida a la proteína (Goldman et al., 1993). Este antifúngico ha sido utilizado en protocolos de transformación genética en hongos como *A. nidulans*, *Neurospora crassa*, *Acremonium chrysogenum*, *Septoria nodorum*, entre otros (Mukherjee et al., 2003). En el gen *tub2*, la transición de una C por una T en el sexto codón, sustituyendo una histidina por una tirosina, genera el alelo resistente a benomilo (Goldman et al., 1993). En esta investigación se demostró que provocando esa mutación puntual en el gen *tub2* por la técnica de PCR, si confiere resistencia a benomilo en *T. atroviride*. Una posible desventaja del uso de benomilo es que se obtuvieron muy pocas colonias transformantes, pero todas mantuvieron su resistencia a benomilo después de los tres pasos monospóricos y en la prueba de estabilidad realizada en poblaciones de conidios generados sin selección. No tuvimos éxito en generar transformantes resistentes a benomilo utilizando las versiones más cortas generadas del

alelo *tub2*, indicando que solo la versión más grande que comprende todo el promotor es funcional. Está documentado que el método de transformación impacta en el número de transformantes que se pueden generar. Furlaneto y colaboradores (1999), utilizando el mismo método de PEG-CaCl obtuvieron 3-6 transformantes por µg de ADN plasmídico por 10^7 protoplastos en *Metarhizium anisoplaie*. Duarte y colaboradores (2007) siguiendo el método de transformación mediado por *Agrobacterium* obtuvieron hasta 53 transformantes por 1×10^5 conidios en *M. anisoplaie*; utilizando el alelo *tub2* resistente a benomilo como marcador de selección, en ambos casos.

Debido que la versión alélica de *tub2* resistente a benomilo solo lleva un cambio en un solo nucleótido, este marcador de selección se debe integrar por recombinación homóloga en el genoma de *T. atroviride*. Para demostrar lo anterior, se amplificó por PCR el gen *tub2* en las transformantes resistentes a benomilo y se determinó el patrón de bandas por restricción con *Xhol*, indicando solo la presencia del alelo *tub2* mutante y su integración ocurrió por recombinación homóloga. Este hallazgo sugiere que este plásmido puede ser utilizado para complementar cepas mutantes, sobre expresar genes heterólogos o para etiquetar proteínas con reporteros fluorescentes en futuras investigaciones, dirigiendo los vectores al genoma de *T. atroviride* por recombinación homóloga al locus *tub2*.

Trichoderma atroviride posee dos genes (*tub1* y *tub2*) que codifican para la β-tubulina con un grado de homología muy alto (Figura 37). El análisis de homología entre Tub1 y Tub2 muestra que en la posición 6 ambas proteínas tienen una histidina, sugiriendo que el benomilo puede interferir con la formación de microtúbulos por interacción con ambas beta-tubulinas. Lo anterior permite interpretar los resultados de baja proporción de esporas resistentes a benomilo, en las transformantes generadas con el alelo *tub2* mutante, como un efecto de la función diferencial de las β tubulinas durante los diferentes estadios de desarrollo de *T. atroviride*, es decir, la proteína Tub1 tiene su principal función en la esporulación y/o germinación. Muchos de los hongos contienen solo un gen de β tubulina, sin embargo, se sabe que algunos como *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *F. graminearum* y *Schizosaccharomyces pombe* también poseen dos genes de β tubulina. En el hongo *F. graminearum* se tienen reportados dos genes de β tubulina con funciones diferentes en el crecimiento de las hifas y la resistencia a los fungicidas. Esto puede sugerir que los genes de tubulina pueden sufrir una divergencia funcional después de los eventos de duplicación de genes en distintos hongos (Zhao et al., 2014).



Figura 37. Homología de las proteínas Tub1 y Tub2 de *T. atroviride*. La alineación de las secuencias de aminoácidos de las beta-tubulinas (Tub1 y Tub2) se realizó usando Lasergene por el método de ClustalW. El asterisco rojo muestra la histidina responsable para la sensibilidad al benomilo en hongos.

Marcador seleccionable a carboxina en *Trichoderma atroviride*

El marcador de selección con resistencia a carboxina ha sido ampliamente utilizado en otras especies de hongos como *Mycosphaerella graminícola*, *M. oryzae*, *Ustilago maydis* y *Aspergillus oryzae*. El mecanismo de acción de la carboxina es afectar la cadena respiratoria al inhibir la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa (Nogueria-López et al., 2019). En este trabajo, se logró construir una variante alélica del gen *sdh*, con una mutación puntual que confiere resistencia a la carboxina, al cambiar el codón 246 que codifica una histidina (CAC) por el codón de una leucina (CTC). Sin embargo, no se logró obtener ninguna transformante de *T. atroviride* con dicho plásmido y su funcionalidad tendrá

que ser evaluada para determinar su funcionalidad en los protocolos de transformación genética de *T. atroviride*.

Aportaciones adicionales en la transformación genética de *T. atroviride*

En *Neurospora crassa* se ha utilizado una técnica del marcador seleccionable dividido (Split marker) para eliminar genes o etiquetado genético de proteínas. La construcción completa para la transformación genética va dividida y en el interior de la célula fúngica se recombinan por la maquinaria de recombinación intrínseca de la célula (Smith et al 2011). El potencial de esta herramienta es que solo las células que efectúan la recombinación del casete dividido son capaces de expresar el marcador de selección y de crecer bajo presión selectiva. Considerando esta estrategia, se diseñaron las variantes alélicas resistentes a benomilo y carboxina sin promotor, esperando que solo aquellas transformantes que integraran por recombinación homóloga los vectores sería capaces de crecer en presencia de los antifúngicos. Sin embargo, debido a que no se obtuvo ninguna transformante con los plásmidos que contenían el gen *sdh* y *tub2* que fueron construidos sin promotor, se propone que, en *T. atroviride* las vectores no se integran pronto como ocurre en *N. crassa*. Una posibilidad es que, al contrario del comportamiento de *N. crassa*, *T. atroviride* propaga los plásmidos libres por un tiempo aun desconocido, durante el cual el promotor es necesario para que la enzima que provee la resistencia al antifúngico se esté expresando dentro de la célula y permitiendo al hongo crecer en presencia del antifúngico; planteando que después de algún tiempo (no conocido) es cuando el gen se inserta por recombinación homóloga al genoma de *Trichoderma*. Sin embargo, por el contrario, cuando el plásmido no posee un promotor para su expresión, es incapaz de producir la enzima y consecuentemente, al agregarle el antifúngico será incapaz de desarrollarse y obtener transformantes.

Por otro lado, se ha reportado que al introducir en *Trichoderma* ADN plasmídico que contiene un marcador de selección, se obtiene una gran cantidad de transformantes. Si el ADN exógeno no tiene homología al genoma de *Trichoderma*, las transformantes son inestables, perdiendo la resistencia al retirarles la presión de selección (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007). Para el caso de la nourseotricina, no se obtuvieron transformantes estables, perdiendo la resistencia al antibiótico después de dejarlas esporular en PDA sin nourseotricina. Estos resultados indican que los plásmidos se propagan por replicación autónoma en *T. atroviride* mientras se mantiene bajo presión selectiva, pero el hongo los

pierde rápidamente bajo condiciones no selectivas, como previamente documentado (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007).

Por otra parte, si el ADN exógeno tiene homología al genoma de *Trichoderma*, se obtienen transformantes estables al integrar el ADN por recombinación homóloga (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2020). En este trabajo, se consideraron estables todas las transformantes que después de seleccionarlas tres pasos monospóricos en presencia de benomilo, se cultivan en medio de cultivo sin selección, los conidios siguen creciendo en presencia del antimitótico. Las transformantes resistentes a benomilo analizadas fueron estables, debido a que estas si lograron crecer en medio con selección; posterior a que se dejaron esporular en medio sin benomilo. El análisis por RCR y restricción de amplicones indicó que el gen *tub2* resistente a benomilo se integró por recombinación homóloga, sugiriendo que la baja proporción de esporas capaces de germinar en presencia de benomilo es un efecto relacionado con las funciones específicas de desarrollo de los genes *tub1* y *tub2* en *T. atroviride*.

12 CONCLUSIONES

El plásmido pBC-NTC confiere resistencia a nourseotricina en *T. atroviride*, indicando que el promotor del gen *gpd* de *Aspergillus nidulans* es funcional en *Trichoderma*.

El análisis de estabilidad de las transformantes resistentes a nourseotricina utilizando pBC-NTC demuestra que la inestabilidad de transformantes está directamente asociado a la pérdida del plásmido, indicando que *Trichoderma* replica los plásmidos en presencia de presión selectiva.

El plásmido pGEM-tub2c con resistencia a benomilo genera transformantes estables en *T. atroviride*, pero presenta baja eficiencia de transformación.

El análisis de transformantes generadas con pGEM-tub2 demuestra que *T. atroviride* integra ADN exógeno principalmente por recombinación homóloga.

Se construyó el plásmido pGEM-sdh con resistencia a carboxina, sin embargo, hace falta probar su funcionalidad en *T. atroviride*.

13 REFERENCIAS

- Andrade-Hoyos, P., Silva-Rojas, H. V., & Romero-Arenas, O. (2020). Endophytic *Trichoderma* Species Isolated from *Persea americana* and *Cinnamomum verum* Roots Reduce Symptoms Caused by *Phytophthora cinnamomi* in Avocado. *Plants* (Basel, Switzerland), 9(9), 1220. <https://doi.org/10.3390/plants9091220>
- Baek, J. M., & Kenerley, C. M. (1998). The arg2 gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genet Biol : FG & B*, 23(1), 34–44. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.1025>
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., & Dinesh-Kumar, S. P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5313), 726–733. <https://doi.org/10.1126/science.276.5313.726>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 7(4), 249–260.
- Błaszczyk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., Jędryczka, M. (2014). *Trichoderma* spp. - application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research*, 54(4), 309-317. <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0047>
- Broomfield, P. L., & Hargreaves, J. A. (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current genetics*, 22(2), 117–121. <https://doi.org/10.1007/BF00351470>
- Calcáneo-Hernández, G., Rojas-Espinosa, E., Landeros-Jaime, F., Cervantes-Chávez, J. A., & Esquivel-Naranjo, E. U. (2020). An efficient transformation system for *Trichoderma atroviride* using the pyr4 gene as a selectable marker. *Braz j microbiol : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 51(4), 1631–1643. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00329-7>
- Cardoza R.E., Vizcaino J.A., Hermosa M.R., Monte E., Gutierrez S. (2006). A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and Agrobacterium-mediated transformation. *J Microbiol*, 44, 383-395.

- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., & Herrera-Estrella, A. (2004). BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology (Reading)*, 150(Pt 11), 3561–3569. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27346-0>
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Rosales-Saavedra, T., Martínez-Hernández, P., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2006). Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot cell*, 5(3), 499–506. <https://doi.org/10.1128/EC.5.3.499-506.2006>
- Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R., & Giles, N. H. (1979). Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5259–5263. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5259>
- Castellanos, F., Schmoll, M., Martínez, P., Tisch, D., Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., & Esquivel-Naranjo, E. U. (2010). Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal genet biol : FG & B*, 47(5), 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.02.001>
- Chen, C. H., Ringelberg, C. S., Gross, R. H., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2009). Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO j*, 28(8), 1029–1042. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.54>
- Contreras-Cornejo, H. A.; Macías-Rodríguez, L.; del-Val, E.; & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol Ecol*, 92.
- Druzhinina, I. S.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera-Estrella, A.; Horwitz, B. A.; Kenerley, C. M.; Monte, E.; Mukherjee, P. K.; Zeilinger, S.; Grigoriev, Igor V.; Kubicek, Christian P. (2011). *Trichoderma: the genomics of opportunistic success*. *Nat Rev Microbiol*, 9, 749–759.
- Esquivel-Naranjo, E. U., & Herrera-Estrella, A. (2007). Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by blr-2 overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology (Reading)*, 153(Pt 11), 3909–3922. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007302-0>

Esquivel-Naranjo, E. U., & Herrera-Estrella, A. (2020). Strong preference for the integration of transforming DNA via homologous recombination in *Trichoderma atroviride*. *Fungal biology*, 124(10), 854–863. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.07.001>

Esquivel-Naranjo, E. U.; García-Esquivel, M.; Medina-Castellanos, E.; Correa-Pérez, V. A.; Parra-Arriaga, J. L.; Landeros-Jaime, F.; Cervantes-Chávez, J. A.; Herrera-Estrella, A. (2016). A *Trichoderma atroviride* stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals. *Mol Microbiol*, 100, 860–876.

Esquivel-Naranjo, E.U. & Herrera-Estrella, A. (2007). Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by blr-2 overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, 153(11), 3909–3922. doi:10.1099/mic.0.2007/007302-0

Fuchs, Y., Saxena, A., Gamble, H. R., & Anderson, J. D. (1989). Ethylene biosynthesis-inducing protein from cellulysin is an endoxylanase. *Plant physiology*, 89(1), 138–143. <https://doi.org/10.1104/pp.89.1.138>

Furlaneto, M.C., Paião, F.G., Pinto, F.G.S. and Fungaro, M.H.P. (1999) Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* to high resistance to benomyl. *Can J Microbiol* 45, 875– 878.

Gabriela Calcáneo-Hernández, María Guadalupe Hernández-Bajonero, Guadalupe Marín-Marín, Marisela Garduño-Rosales, Fidel Landeros-Jaime, Rosa Reyna Mouríño-Pérez, Alfredo Herrera-Estrella, Edgardo Ulises Esquivel-Naranjo. Cellular stress responses, cell wall integrity, conidiation, and hyphal regeneration are regulated by the Tmk1 MAPK pathway in *Trichoderma atroviride*

Goldman, G. H., Temmerman, W., Jacobs, D., Contreras, R., Van Montagu, M., & Herrera-Estrella, A. (1993). A nucleotide substitution in one of the beta-tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate. *Mol Gen Genet: MGG*, 240(1), 73–80. <https://doi.org/10.1007/BF00276886>

Goldman, G., Van, M. M., Herrera-Estrella, A. (1990). Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr. Genet.*, 17. 169-174 DOI:10.1007/BF00312863

- Gressel, J., & Galun, E. (1967). Morphogenesis in *Trichoderma*: photoinduction and RNA. *Dev biol*, 15(6), 575–598. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(67\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(67)90054-1)
- Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C. P., & de Graaff, L. H. (1990). The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. *Current genetics*, 18(1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/BF00321118>
- Gruber, S., & Zeilinger, S. (2014). The transcription factor Ste12 mediates the regulatory role of the Tmk1 MAP kinase in mycoparasitism and vegetative hyphal fusion in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *PLoS one*, 9(10), e111636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111636>
- Gruber, S., Omann, M., Rodríguez, C. E., Radebner, T., & Zeilinger, S. (2012). Generation of *Trichoderma atroviride* mutants with constitutively activated G protein signaling by using geneticin resistance as selection marker. *BMC Res Notes*, 5, 641. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-641>
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2019). Trichoderma Species: Versatile Plant Symbionts. *Phytopathology*, 109(1), 6–16. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Harman, Gary E.; Howell, Charles R.; Viterbo, Ada; Chet, Ilan; Lorito, Matteo (2004). *Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts.* , 2(1), 43–56. doi:10.1038/nrmicro797
- Hernández-Oñate, M.A., Esquivel-Naranjo, E.U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A. & Herrera-Estrella, A. (2012). An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 14918-14923
- Herrera-Estrella, A., & Horwitz, B. A. (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol microbiol*, 64(1), 5–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05632.x>
- Herrera-Estrella, A., Goldman, G. H., & Van Montagu, M. (1990). High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Mol microbiol*, 4(5), 839–843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00654.x>

- Hewedy, O. A., Abdel Lateif, K. S., Seleiman, M. F., Shami, A., Albarakaty, F. M., & M El-Meihy, R. (2020). Phylogenetic Diversity of *Trichoderma* Strains and Their Antagonistic Potential against Soil-Borne Pathogens under Stress Conditions. *Biology*, 9(8), 189. <https://doi.org/10.3390/biology9080189>
- Horwitz, B. A.; Perlman, A.; Gressel, J., (1990). *Trichoderma* sporulation by nanosecond laser pulses: evidence against cryptochrome cycling. *Photochem Photobiol.*, 51, 99–104.
- Howell C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant dis*, 87(1), 4–10. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Huang, Y., Wang, Z., Peng, Y., Xu, R., Yan, J., Xiong, C., Ma, J., Zhong, K., & Lu, H. (2022). Carboxin can induce cardiotoxicity in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 233, 113318. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113318>
- Kilaru, S., Collins, C. M., Hartley, A. J., Burns, C., Foster, G. D., & Bailey, A. M. (2009). Investigating dominant selection markers for *Coprinopsis cinerea*: a carboxin resistance system and re-evaluation of hygromycin and phleomycin resistance vectors. *Current genetics*, 55(5), 543–550. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0266-6>
- Kochupurakkal, B. S., & Iglehart, J. D. (2013). Nourseothricin N-acetyl transferase: a positive selection marker for mammalian cells. *PloS one*, 8(7), e68509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068509>
- Lehman, S. S., Mladinich, K. M., Boonyakanog, A., Mima, T., Karkhoff-Schweizer, R. R., & Schweizer, H. P. (2016). Versatile nourseothricin and streptomycin/spectinomycin resistance gene cassettes and their use in chromosome integration vectors. *Journal of microbiological methods*, 129, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.018>
- Lehman, S. S., Mladinich, K. M., Boonyakanog, A., Mima, T., Karkhoff-Schweizer, R. R., & Schweizer, H. P. (2016). Versatile nourseothricin and streptomycin/spectinomycin resistance gene cassettes and their use in chromosome integration vectors. *Journal of microbiological methods*, 129, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.018>
- Li, D., Tang, Y., Lin, J. L.; Cai W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microb Cell Fact* 16, 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7>

- Li, M. F., Li, G. H., & Zhang, K. Q. (2019). Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma* spp. *Metabolites*, 9(3), 58. <https://doi.org/10.3390/metabo9030058>
- Li, T. T., Zhang, J. D., Tang, J. Q., Liu, Z. C., Li, Y. Q., Chen, J., & Zou, L. W. (2020). Combined Use of *Trichoderma atroviride* CCTCCSBW0199 and Brassinolide to Control *Botrytis cinerea* Infection in Tomato. *Plant disease*, 104(5), 1298–1304. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1568-RE>
- Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., & Harman, G. E. (1993). Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Current genetics*, 24(4), 349–356. <https://doi.org/10.1007/BF00336788>
- Luo, Y., Zhang, D. D., Dong, X. W., Zhao, P. B., Chen, L. L., Song, X. Y., Wang, X. J., Chen, X. L., Shi, M., & Zhang, Y. Z. (2010). Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. *FEMS microbiology letters*, 313(2), 120–126. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02135.x>
- Ma, J.; Tsegaye, E.; Li, M., Wu, B.; & Jiang, X. (2020). Biodiversity of *Trichoderma* from grassland and forest ecosystems in Northern Xinjiang, China. *3 Biotech*, 10(8), 362
- Mach, R. L., Schindler, M., & Kubicek, C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Current genetics*, 25(6), 567–570. <https://doi.org/10.1007/BF00351679>
- Magaña-Ortíz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vazquez, E., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2013). A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. *Fungal genet biol : FG & B*, 56, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.03.008>
- Mendoza-Mendoza, A., Rosales-Saavedra, T., Cortés, C., Castellanos-Juárez, V., Martínez, P., & Herrera-Estrella, A. (2007). The MAP kinase TVK1 regulates conidiation, hydrophobicity and the expression of genes encoding cell wall proteins in the fungus *Trichoderma virens*. *Microbiology (Reading)*, 153(Pt 7), 2137–2147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/005462-0>
- Mironenka, J., Różalska, S., Soboń, A., & Bernat, P. (2021). *Trichoderma harzianum* metabolites disturb *Fusarium culmorum* metabolism: Metabolomic and proteomic studies. *Microbiol Res.*, 249, 126770. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126770>

- Mishra, N. C., & Tatum, E. L. (1973). Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(12), 3875–3879. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3875>
- Moreno-Ruiz, D., Lichius, A., Turrà, D., Di Pietro, A., & Zeilinger, S. (2020). Chemotropism Assays for Plant Symbiosis and Mycoparasitism Related Compound Screening in *Trichoderma atroviride*. *Front microbiol*, 11, 601251. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601251>
- Mukherjee, M., Hadar, R., Mukherjee, P. K., & Horwitz, B. A. (2003). Homologous expression of a mutated beta-tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *Journal of applied microbiology*, 95(4), 861–867. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02061.x>
- Nogueira-López, G., Padilla-Arizmendi, F., Inwood, S., Lyne, S., Steyaert, J. M., Nieto-Jacobo, M. F., Stewart, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2019). TrichoGate: An Improved Vector System for a Large Scale of Functional Analysis of *Trichoderma* Genes. *Front Microbiol*, 10, 2794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02794>
- Padilla-Guerrero, I. E., & Bidochka, M. J. (2017). *Agrobacterium*-Mediated Co-transformation of Multiple Genes in *Metarrhizium robertsii*. *Mycobiology*, 45(2), 84–89. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.2.84>
- Papp, O., Kocsis, T., Biró, B., Jung, T., Ganszky, D., Abod, É., Tirczka, I., Tóthné Bogdányi, F., & Drexler, D. (2021). Co-Inoculation of Organic Potato with Fungi and Bacteria at High Disease Severity of *Rhizoctonia solani* and *Streptomyces* spp. Increases Beneficial Effects. *Microorganisms*, 9(10), 2028. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102028>
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E., & Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61(2), 155–164. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90110-7)
- Peterbauer C. K., Heidenreich E., Baker R. T., Kubicek C. P. (1992). Effect of benomyl and benomyl resistance on cellulase formation by *Trichoderma reesei* and *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 38 1292–1297. 10.1139/m92-213

- Reithner, B., Schuhmacher, R., Stoppacher, N., Pucher, M., Brunner, K., & Zeilinger, S. (2007). Signaling via the Trichoderma atroviride mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 44(11), 1123–1133. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.04.001>
- Roco A., Perez L.M., (2001). In vitro biocontrol activity of Trichoderma harzianum on Alternaria alternata in the presence of growth regulators, *Electron. J. Biotechnol.* 4. 68–73.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E. U., Casas-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C., & Herrera-Estrella, A. (2006). Novel light-regulated genes in Trichoderma atroviride: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology (Reading)*, 152(Pt 11), 3305–3317. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29000-0>
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L., & Lorito, M. (2009). Identification of a new biocontrol gene in Trichoderma atroviride: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol plant microbe interact : MPMI*, 22(3), 291–301. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-3-0291>
- Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, E. U., & Herrera-Estrella, A. (2010). Trichoderma in the light of day-physiology and development. *Fungal genet biol: FG & B*, 47(11), 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.010>
- Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 202
- Shima, Y., Ito, Y., Kaneko, S., Hatabayashi, H., Watanabe, Y., Adachi, Y., & Yabe, K. (2009). Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in Aspergillus oryzae. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 46(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.10.005>
- Smith, K. M., Phatale, P. A., Sullivan, C. M., Pomraning, K. R., & Freitag, M. (2011). Heterochromatin is required for normal distribution of Neurospora crassa CenH3. *Molecular and cellular biology*, 31(12), 2528–2542. <https://doi.org/10.1128/MCB.01285-10>

Stracquadanio, C., Quiles, J. M., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2020). Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. *J fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4), 263. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>

Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., & Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26(2-3), 205–221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90191-9)

Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ścisł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *Int J Mol Sci*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

Yadav, M., Dubey, M. K., & Upadhyay, R. S. (2021). Systemic Resistance in Chilli Pepper against Anthracnose (Caused by *Colletotrichum truncatum*) Induced by *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Paenibacillus dendritiformis*. *J fungi (Basel)*, 7(4), 307. <https://doi.org/10.3390/jof7040307>

Yang, X., Peng, J., & Pan, J. (2019). Nourseothricin N-acetyl transferase (NAT), a new selectable marker for nuclear gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant methods*, 15, 140. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0526-5>

Zähringer, U., Voigt, W., & Seltmann, G. (1993). Nourseothricin (streptothricin) inactivated by a plasmid pIE636 encoded acetyl transferase of *Escherichia coli*: location of the acetyl group. *FEMS microbiology letters*, 110(3), 331–334. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06344.x>

Zehra, A., Raytekar, N. A., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. *Curr Res Microb Sci*, 2, 100054. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100054>

Zeilinger S. (2004). Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via Agrobacterium-mediated transformation. *Current genetics*, 45(1), 54–60. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0454-8>

Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M., & Kubicek, C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of

Trichoderma harzianum with its host. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 26(2), 131–140. <https://doi.org/10.1006/fqbi.1998.1111>

Zhao, Z., Liu, H., Luo, Y., Zhou, S., An, L., Wang, C., Jin, Q., Zhou, M., & Xu, J. R. (2014). Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *Scientific reports*, 4, 6746. <https://doi.org/10.1038/srep06746>