

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología



IMPLEMENTACIÓN DEL GEN *arg2* COMO MARCADOR DE SELECCIÓN EN *Trichoderma atroviride*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

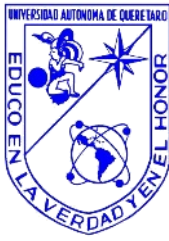
Presenta

Omar Nieves Ugalde

Dirigido por

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Santiago de Querétaro, Qro. México, Noviembre 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología



IMPLEMENTACIÓN DEL GEN *arg2* COMO MARCADOR DE SELECCIÓN EN *Trichoderma atroviride*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta

Omar Nieves Ugalde

Exp. 197075

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Director

Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Sinodal

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime
Sinodal

Firma

M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández
Sinodal

Firma

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro. México, Noviembre 2015

RESUMEN

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso, comúnmente encontrado en el suelo, que presenta una alta actividad antagónica y un estilo de vida micoparasítico contra hongos patógenos de plantas (Herrera-Estrella y Chet, 1998). Además, posee una alta capacidad productora de enzimas y metabolitos de importancia biotecnológica. Actualmente, se han secuenciado al menos cinco especies de *Trichoderma* y sus códigos se encuentran en base datos públicos. Sin embargo, la genómica funcional en estos hongos se encuentra limitado principalmente al uso del marcador de selección *hph* que confiere resistencia al antibiótico higromicina B. Adicionalmente la generación de mutantes auxótrofos ha resultado un método eficiente, seguro y barato. En este trabajo se exploró la posibilidad de generar mutantes auxótrofos a arginina e implementar el gen *arg2* como un marcador seleccionable en *T. atroviride*, mediante reemplazo génico, usando secuencias homologas que flanquean el marcador de selección *hph*, se generaron mutantes auxótrofos a arginina mediante la eliminación del gen *arg2*, que codifica la subunidad pequeña de la carbamoil fosfato sintetasa (CFS), la cual cataliza la producción de carbamoil fosfato que es un substrato para la biosíntesis de citrulina, y, este a su vez, es un intermediario en la síntesis de arginina. La arginina es un aminoácido esencial para la formación de proteínas y nucleótidos, por lo cual una mutante auxótrofa a arginina ($\Delta arg2$) será incapaz de desarrollarse al menos que el medio de cultivo sea enriquecido con este aminoácido. Después de seleccionar los transformantes durante tres cultivos monospóricos, las mutantes fueron identificadas mediante pruebas de auxotrofia e identificadas molecularmente mediante pruebas de PCR. Posteriormente, se determinó que 50mM de L- arginina restaura el crecimiento, la reproducción asexual inducida por la luz y al daño mecánico a un nivel comparable a la cepa silvestre. Finalmente, 600 pares de bases rio arriba y rio debajo de la región codificante del gen *arg2* es el tamaño mínimo suficiente para complementar las mutantes auxótrofos a arginina.

Palabras clave: (*Trichoderma atroviride*, auxotrofia, arginina, doble recombinación homóloga).

SUMMARY

Trichoderma atroviride is a filamentous fungus, commonly found in soil, which have high antagonistic activity and a mycoparasitic life style against plant pathogenic fungi (Herrera-Estrella and Chet, 1998). In addition, they have a high capacity for enzyme and metabolites production of biotechnological importance. Currently, at least five species of *Trichoderma* have been sequencing and these are available in public databases. However, functional genomics in these fungi is mainly limited to *hph* selectable marker, which in fungi confer resistance to the antibiotic hygromycin B. In addition, the generation of mutants auxotrophic have resulted in a safe, cheap, and efficient method. Here we explored the possibility to generate mutants auxotrophic to arginine and to implement the *arg2* gene as a selectable marker in *T. atroviride*, by gene replacement using homologous sequences flanking the marker *hph* gene, arginine auxotrophic mutants were generated by removing the complete coding region of *arg2* gene, encoding the small subunit of carbamoyl phosphate synthetase (CFS), which catalyzes the production of carbamoyl phosphate, the least is a substrate for the biosynthesis of citrulline, an intermediate in the synthesis of arginine. Arginine is an essential amino acid in biosynthesis of proteins and nucleotides, thereby an arginine auxotrophic mutant (Δ arg2), will be unable to grow unless the culture medium contains this amino acid. The transformants were selected during three monosporic cultures and then the mutants were identify by auxotrophy test and by PCR. Subsequently, the auxotrophy was restored with 50mM L- arginine, recovering growth and asexual reproduction stimulated by light and damage at a comparable level than the wild type strain. Finally, 600 bp upstream and downstream of the coding region were the minimum size of *arg2* gene capable to complement the auxotrophy phenotype.

Key words: (*Trichoderma atroviride*, *auxotrophy*, *arginine*, *double homologous recombination*).

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico a mis padres Azael y Elena, por todo el cariño y apoyo incondicional que me han entregado cada día, por ayudarme a ser quien soy ahora.

A Elsa y Jonathan mis hermanos, que son inspiración para continuar y seguir adelante.

Y a toda mi familia, que tanto ha creído en mí, porque sé que estarán ahí para animarme sin importar nada.

Esto es por ustedes.

Agradecimientos

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo, por haberme dado la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo, por su ayuda, y por su apoyo. .

A mis tutores por su ayuda y su tiempo, Dr. José Antonio Cervantes Chávez, Dr. Fidel Landeros Jaime y M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández. -..

Gracias a la Universidad Autónoma de Querétaro y a todos mis profesores, por ser parte de mi formación profesional, por todo lo que me ofreció. ...-

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada del proyecto de Ciencia Básica-SEP CB-2011-1 del convenio 169045. .-

A la SEP por la beca otorgada a través del proyecto de Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo asignado al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo con folio UAQ-PTC-253.

Al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación UAQ-2012 por los recursos asignados para la realización de esta investigación a través del proyecto “GENERACIÓN DE CEPAS AUXOTROFAS IMPLEMENTANDO UNA ESTRATEGÍA DEL RECICLAJE DEL MARCADOR DE SELECCIÓN EN EL HONGO FILAMENTOSO *Trichoderma atroviride*” con el registro FNB-2012-10.

A mis amigos de estos últimos años, ellos que han estado ahí en las más variadas situaciones, quiero agradecerles a ese par, por todo lo que han hecho y solo puedo decir que ojala que continuemos así.

Somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no porque la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura

-Bernardo de Chartres

CONTENIDO

I.- INTRODUCCIÓN.....	13
II.- ANTECEDENTES.....	15
2.1 Generalidades de los hongos.....	15
2.2 Género <i>Trichoderma</i>	15
2.3 <i>Trichoderma atroviride</i>	16
2.4 Síntesis de arginina y el gen <i>arg2</i>	18
2.5 Métodos usados para la generación de auxotrofías.....	20
2.6 Transformación genética de hongos.....	21
2.7 Marcadores de selección.....	22
III.- JUSTIFICACIÓN.....	24
IV.- HIPÓTESIS.....	25
V.- OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos específicos.....	26
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1 Obtención de mutantes auxótrofos a arginina.....	27
6.1.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	27
6.1.2 Análisis in silico del gen <i>arg2</i>	27
6.1.3 Diseño de oligonucleótidos para eliminación del gen <i>arg2</i> por PCR.....	28
6.1.4 Eliminación del gen <i>arg2</i> por PCR.....	29
6.1.5 Purificación de productos de PCR	30
6.1.6 Transformación de protoplastos para la eliminación de <i>arg2</i> por el método de polietilenglicol.....	32
6.1.7 Pruebas de auxotrofia para identificar mutantes carentes del gen <i>arg2</i> .	34
6.1.8 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos.....	34
6.1.9 Identificación de mutantes auxótrofos por PCR.....	35
6.2 Caracterización fenotípica de mutantes auxótrofos $\Delta arg2$	37
6.2.1 Determinación de la concentración mínima de L- arginina que restaura la auxotrofia.....	37
6.2.2 Producción de conidios estimulada por la luz.....	37

6.2.3 Daño mecánico.....	38
6.3 Complementación de la auxotrofia.....	38
6.3.1 Construcción de casetes para la complementación de auxotrofia.....	38
6.3.2 Complementación de la auxotrofia a arginina con el gen <i>arg2</i>	40
6.3.3 Identificación molecular de las cepas complementadas mediante PCR	41
6.3.4 Pruebas de complementación fenotípica	42
6.4 Análisis estadístico.....	42
VII.- RESULTADOS.....	43
7.1 Obtención de mutantes auxótrofas a arginina.....	43
7.1.1 Identificación del gen <i>arg2</i> en <i>Trichoderma atroviride</i>	43
7.1.2 Construcción del casete para la eliminación de <i>arg2</i>	43
7.1.3 Transformación de protoplastos de <i>Trichoderma atroviride</i> para la eliminación de <i>arg2</i>	44
7.1.4 Identificación de transformantes auxótrofas.....	45
7.1.5 Determinación del reemplazo génico en las cepas auxótrofas mediante PCR.....	46
7.2 Caracterización fenotípica de mutantes auxótrofas $\Delta arg2$	48
7.2.1 Restauración de la auxotrofia con L-arginina en cepas $\Delta arg2$	48
7.2.2 Producción de conidios en cepas $\Delta arg2$	50
7.2.3 Conidiación inducida por daño mecánico en cepas $\Delta arg2$	52
7.3 Complementación de la auxotrofia.....	53
7.3.1 Complementación de la auxotrofia en una cepa $\Delta arg2$	53
7.3.2 Identificación molecular de complementación mediante PCR.....	56
7.3.3 Producción de conidios inducidos por la luz y daño en las cepas complementadas	57
VIII.- DISCUSIÓN.....	59
8.1 Obtención de mutantes auxótrofas a arginina.....	59
8.2 Caracterización fenotípica de mutantes auxótrofas $\Delta arg2$	60
8.3 Complementación de la auxotrofia.....	61
IX.- CONCLUSIONES.....	64

X.- PERSPECTIVAS.....	65
XI.- BIBLIOGRAFIA.....	66

Índice de figuras:

	Pág.
Figura 1. Morfología de <i>T. atroviride</i>	17
Figura 2. Vías metabólicas para la síntesis de arginina.....	19
Figura 3. Técnica de PCR doble unión para construir el casete carente de la región codificante del gen <i>arg2</i>	31
Figura 4. Reemplazo génico de <i>arg2</i> por el marcador de selección <i>hph</i> mediante doble recombinación homóloga en <i>T. atroviride</i>	33
Figura 5. Oligonucleótidos usados para la identificación molecular de mutantes auxótrofas.....	36
Figura 6. Versiones del gen <i>arg2</i> usadas para la prueba de complementación.....	40
Figura 7. Locus <i>arg2</i>	43
Figura 8. Construcción del casete para el remplazo del gen <i>arg2</i>	44
Figura 9. Transformación de protoplastos de <i>T. atroviride</i> con la construcción $\Delta arg2$	45
Figura 10. Prueba de auxotrofia fenotípica.....	46
Figura 11. Identificación de mutantes auxótrofas mediante PCR.....	47
Figura 12. Determinación de la concentración mínima de L- arginina necesaria para restaurar la auxotrofia.....	49
Figura 13. Producción de conidios inducidos por la luz en cepas WT y $\Delta arg2$	51
Figura 14. Producción de conidios como respuesta al daño mecánico en las cepas WT y $\Delta arg2$	52
Figura 15. Amplicones de versiones cortas del gen <i>arg2</i>	53

Figura 16. Complementación de auxotrofía.....	55
Figura 17. Identificación molecular de complementantes <i>arg2+</i>	56
Figura 18. Producción de conidios, respuesta a daño y luz en cepas complementantes (<i>arg2+</i>).....	58

Índice de Tablas:

	Pág.
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la generación de auxotrofía.....	29
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para construir diferentes versiones del gen <i>arg2</i> que complementen la auxotrofía.....	39

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades en una gran variedad de cultivos y tanto los costos para el control de los patógenos como el de las pérdidas causadas por estos mismos alcanza el billón de euros anuales para un solo tipo de patógeno (Dean *et al.*, 2012). Además de los altos costos económicos que el control químico tiene, también pueden existir repercusiones en otros organismos, como las micorrizas e inclusive en la salud pública. Esto ha promovido la implementación de organismos benéficos en programas de control biológico de enfermedades en cultivos de importancia económica (Hermosa *et al.*, 2012).

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso con actividad antagonista contra hongos fitopatógenos. Los mecanismos descritos implicados en el antagonismo son la competencia por nutrientes, antibiosis y micoparasitismo. Estas propiedades se han explorado para controlar enfermedades en cultivos con el objetivo de disminuir la aplicación de agroquímicos y por lo tanto mejorar tanto la calidad como la producción de los alimentos cultivados. Sin embargo, el control biológico es de lenta acción comparado con el control químico, por lo que es necesario profundizar en el conocimiento sobre la biología del organismo antagonista para mejorar su capacidad de control de las enfermedades provocadas por los hongos fitopatógenos (Shoresh *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2012).

Se han desarrollado herramientas como la generación de mutantes auxótrofas y la implementación de genes de resistencia a los antibióticos, como marcadores de selección en métodos de transformación genética para poder dilucidar los factores genéticos y moleculares directamente implicados en las funciones de *Trichoderma*, tales como las de antagonista, micoparásito, producción de metabolitos, entre otros (Herrera-Estrella y Chet, 1998; Baek y Kenerley, 1998; Zhu-Mei *et al.*, 2007).

El problema que ha acompañado a la generación de cepas auxótrofas es que éstas han sido generadas mediante mutagénesis saturante, usando métodos físicos como la exposición a radiación UV o por métodos químicos mediante tratamientos con sustancias como 4-nitroquinolina 1-óxido (NQO) (Bal *et al.*, 1977; Baek y Kenerley, 1998). Dada la naturaleza de estos métodos de mutagénesis usados para la generación de mutantes auxótrofas, no son específicos lo que causa cambios en cualquier parte del genoma de la célula, generando así múltiples mutaciones en el fondo genético que generalmente complican las investigaciones.

Para ello se propone una aproximación novedosa, que consiste en generar mutantes auxótrofas dirigidas de tal manera que solo impliquen al gen en cuestión, sin afectar el resto del genoma de *T. atroviride*, por consiguiente sin generar mutaciones indeseadas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas, los hay tanto unicelulares como las levaduras y los pluricelulares que componen la gran mayoría del grupo. Los hongos tienen una pared celular que está compuesta principalmente por quitina (N- acetil D- glucosamina), glucanos y otros polímeros como mananos, quitosano y galactanos (Latgé, 2007). La pared celular tiene el mismo propósito que la de las plantas y las bacterias; que es el proteger y dar rigidez a la célula. La mayoría de estos organismos son aerobios, solo algunos como las levaduras llegan a ser anaerobios facultativos. Son organismos quimio-organo-heterótrofos, saprobios y se alimentan utilizando exoenzimas para degradar las moléculas orgánicas complejas, liberando los productos solubles que absorben (Carlile, 2001). La mayoría presentan reproducción de tipo sexual (teleomorfo) y asexual (anamorfo). Las levaduras se dividen por gemación o fisión, mientras que los hongos filamentosos presentan un crecimiento apical polarizado (Bartnicki-García, 1996).

2.2 Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* comprende un gran número de especies filamentosas rizocompetentes que se encuentran en una gran variedad de ecosistemas, en su gran mayoría de suelos de bosques y de uso agrícola (Jensen-Wolffhechel, 1995). Estos hongos se clasifican como *Ascomycota*, Clase *Pyrenomycetes*, Orden *Hypocreales*, Género *Hypocrea-Trichoderma*. Principalmente su ciclo de vida es asexual con la alternancia entre micelio y conidios. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, septadas, con más de un núcleo por célula. Los conidios (Figura 1), son el producto de la reproducción asexual que tienen solo un núcleo haploide, son esféricos de color verdoso y estos son generados en la parte apical de células en forma de

botella, llamadas fiálides, que se forman en las estructuras reproductivas aéreas denominadas conidióforos (Rosen *et al.*, 1974). Frente a condiciones adversas, como el estrés nutricional, llegan a formar estructuras de resistencia/reproducción llamadas clamidosporas (Papavizas *et al.*, 1985; Uresti-Rivera, 2008). Entre las varias características que hacen al género *Trichoderma* un grupo atractivo para su aplicación como herramienta de biocontrol es la actividad micoparasítica de hongos fitopatógenos (Kubicek y Harman, 2002).

Actualmente se han descifrado y analizado los genomas de cinco especies de *Trichoderma*, de los que se han identificado 440 genes relacionados con el metabolismo secundario y un gran número de genes con el estilo de vida micoparasítico (Kubicek *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2012); es por ello que la identificación o generación de cepas con mejor capacidad micoparasítica, mayor producción de antibióticos y enzimas mejoradas ha sido un reto, para mejorar su desempeño en el control biológico de enfermedades en plantas (Lumsden *et al.*, 1996). A pesar de contar con las secuencias genéticas de diferentes especies de *Trichoderma*, del 40% de los genes codificantes para proteínas se ha logrado asignar una función hipotética mediante técnicas de bioinformática, lo que demanda la implementación de mejores estrategias de genómica funcional para comprender mejor la biología de estos hongos de importancia biotecnológica

2.3 *Trichoderma atroviride*

El hongo filamentoso *T. atroviride* es de vida libre y se distribuye de manera generalizada en la rizosfera en una gran variedad de climas desde los cálidos a los templados. En su fase teleomorfa (sexual) era conocido como *Hypocrea atroviridis* (Dodd *et al.*, 2003). En cuanto a su estado asexual, éste presenta un rápido crecimiento de micelio y la generación de conidios esféricos, que van del color blanco a verde oscuro. La conidiogénesis le permite al hongo dispersarse y sobrevivir a condiciones hostiles y se da como una respuesta al estrés ambiental como la luz, pH, disponibilidad de nutrientes y estrés (Figura 1).

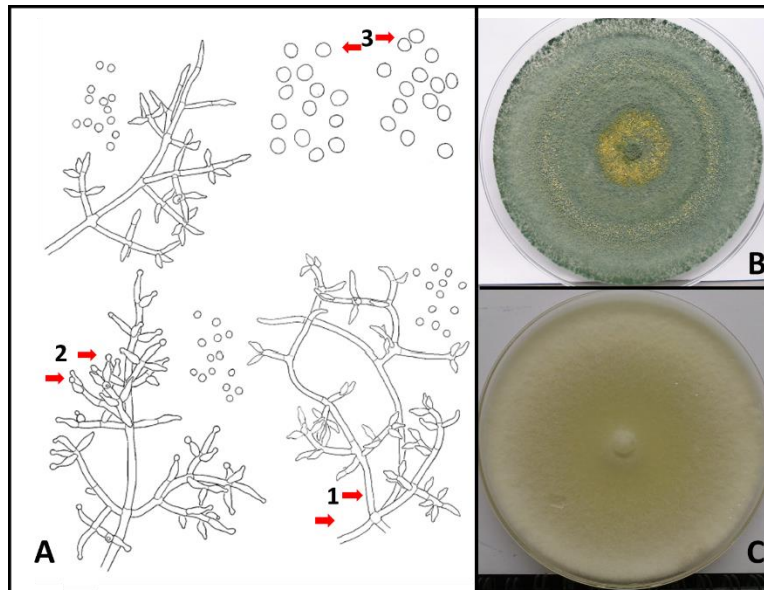


Figura 1. Morfología de *T. atroviride*. (A) 1-3, Porción apical de conidióforos y conidios donde se muestran las principales estructuras de *T. atroviride*. 1= Hifas, 2= Fiálides, 3= Conidios. (B) *T. atroviride* creciendo en medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa) durante 7 días, los conidios presentan coloración verdosa. (C), La misma cepa de *T. atroviride* crecida en PDA en total oscuridad, la cual no presenta generación de conidios y por lo tanto la colonia tiene coloraciones blanquecinas (Modificado Bisette, 1991).

Los conidios son los inóculos utilizados para su aplicación en campo en programas de biocontrol; debido a su facilidad de manejo y a su capacidad de resistir condiciones ambientales adversas (Verma *et al.*, 2007). Una vez que el hongo se establece en la rizosfera, éste se integra rápidamente en la comunidad microbiana de la misma y mantiene el control de hongos fitopatógenos tales como *Botrytis cinerea*, *Fusarium spp.*, *Phytium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsi* que son patógenos de: tomate, frijol, fresa, algodón y uva (Hjeljord *et al.*, 2000; Kubicek y Harman, 2002; Grigoriev *et al.*, 2011; Shores *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2012).

Trichoderma atroviride detecta al hongo fitopatógeno y responde con la formación de estructuras denominadas apresorios y la secreción de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular con el objetivo de asimilar el contenido celular del hongo huésped (Benitez *et al.*, 2004). En *Trichoderma spp.* se ha descrito

un gran número de metabolitos con actividad antimicrobiana, entre ellos se encuentran los peptaiboles y los antibióticos como la gliotoxina (Wiest *et al.*, 2002).

2.4 Síntesis de arginina y el gen *arg2*

La arginina es un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas y nucleótidos, por ello la importancia de generar mutantes auxótrofas y su aplicación como marcador de selección, el cual ya ha sido utilizado en varios hongos modelos de estudio como *Aspergillus nidulans* (Penttila *et al.*, 1987), *Neurospora crassa* (Luo y Sachs, 1996), *Saccharomyces cerevisiae* (Messenguy, 1976) y *Trichoderma virens* (Baek y Kenerley., 1998).

El metabolismo de la arginina ha sido intensivamente estudiado en varios organismos a partir de su descubrimiento en el ciclo de la urea en mamíferos. La ruta de la síntesis de la arginina fue un ejemplo clásico de la relación: un gen una enzima, como se demostró en *N. crassa* (Beadle y Tatum, 1941). Además se ha identificado en la síntesis de arginina tres mecanismos importantes que son: la síntesis de ornitina, la síntesis de carbamoil fosfato y la posterior conversión de estos dos en arginina.

El carbamoil fosfato es un precursor metabólico de la ruta de la biosíntesis de la arginina, urea y nucleótidos pirimidínicos. Dependiendo de la fuente de nitrógeno existen tres tipos de carbamoil fosfato sintetasa (CFS), de las cuales solo dos CFS se encuentran en hongos, una de ellas en la ruta de síntesis de pirimidinas (CFS- P) y otra involucrada en la síntesis de arginina (CFS- A). Las dos enzimas son reguladas independientemente y son transcritas por genes específicos (Baek y Kenerley, 1998).

La CFS-A utiliza nitrógeno del grupo amida de la glutamina, dos moléculas de adenosín trifosfato (ATP) y bicarbonato para formar carbamoil fosfato, fosfato inorgánico y adenosín difosfato (ADP) (Figura 2).

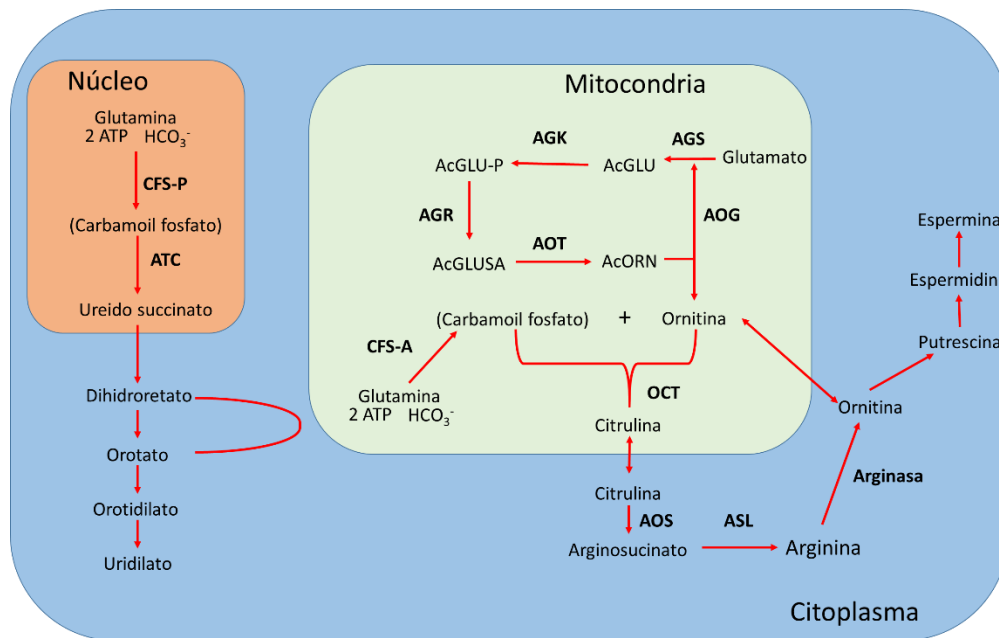


Figura 2. Vías metabólicas para la síntesis de arginina. La figura representa las reacciones bioquímicas y la acción de las enzimas para llevar a cabo la síntesis de arginina en la célula del hongo. Abreviaciones: **CFS-P**, Carbamoil fosfato sintetasa específica de pirimidina; **ATC**, Aspartato carbamoiltransferasa; **CFS-A**, Carbamoil fosfato sintetasa específica de arginina; **AGR**, Acetil glutamil-P reductasa; **AOT**, Acetil glutamato transaminasa; **AOG**, Acetil ornitina glutamato-acetiltransferasa; **AGS**, Acetil glutamato sintetasa; **AGK**, Acetil glutamato cinasa; **OCT**, Ornitin carbamoil transferasa; **AOS**, Arginosuccinato sintetasa; **ASL**, Arginosuccinato liasa. (Modificada, Davis 1986).

La CFS-A es una enzima compuesta por dos subunidades, 1) la subunidad pequeña tiene actividad de glutamina amidotransferasa y 2) la subunidad grande posee actividad de carbamoil fosfoquinasa. Ambas se sintetizan en el citoplasma de la célula y son ensambladas después de ser transferidas a la mitocondria. Los genes encargados de codificar las unidades de la CFS-A son: la subunidad mayor es codificada por gen *arg3* mientras que el gen *arg2* codifica la subunidad pequeña (Davis, 1986), cuyos tamaños de las subunidades de la CFS-A en *T. atroviride* son de 4,111 pares de bases (pb) y 1,442 pb respectivamente.

2.5 Métodos usados para la generación de auxotrofías

La obtención de mutantes auxótrofos para su implementación como marcadores de selección se generan en su mayoría mediante la radiación con luz ultravioleta (UV) así como con agentes mutagénicos, ambas son técnicas no específicas que causan alteración a gran escala en el genoma de un organismo (Bergés y Barreau, 1991; Gruber *et al.*, 1993; Antal *et al.*, 1997; Baek y Kenerley, 1998). Un organismo auxótrofo es aquél que ha perdido la capacidad de sintetizar cierta sustancia requerida para su crecimiento, esto debido a la presencia de mutaciones. Las mutaciones son cambios heredables en la secuencia de ADN y un organismo mutante es aquel que desciende directamente de un organismo normal (silvestre). Comparado con los organismos silvestres (protótrofos), los organismos auxótrofos no pueden crecer en un medio mínimo si no se suministran los correspondientes nutrientes. Las cepas mutantes auxótrofas han sido ampliamente utilizadas para la investigación genética, en arqueas, bacterias y hongos filamentosos (Lv *et al.*, 2015).

Se han explorado varios métodos para la manipulación genética de los hongos filamentosos. Los primeros en desarrollarse parten del principio que la radiación UV y los rayos X generan mutaciones en el ADN. Estos métodos de transformación consisten en la exposición de las hifas o esporas a la radiación y mediante una búsqueda exhaustiva, con procedimientos como el enriquecimiento por filtración, se identifican los fenotipos mutantes. Las primeras mutantes auxótrofas en hongos filamentosos fueron obtenidas en *N. sitopila*, *N. crassa* (Beadle y Tatum, 1941) y *Ophiostoma multiannulatum* (Fries, 1947). Posteriormente la técnica para encontrar mutantes se mejoró mediante la búsqueda de fenotipos con medios selectivos, pero el método para la generación de las mutantes seguía siendo prácticamente el mismo (Woodward *et al.*, 1954; Catcheside, 1954). Otra metodología para la obtención de mutantes auxótrofos es a través de la exposición de los hongos a agentes químicos mutagénicos, como el NQO en *A. nidulans* (Bal *et al.*, 1977) y N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina en *T. harzianum*, *T. koningii*, *T.*

polysporum y *T. viride* (Ahmad y Baker, 1988), pero al igual que los rayos X y la luz UV, la mutagénesis química no es dirigida y afecta prácticamente cualquier región del genoma de una célula, generando fondos genéticos complicados de explicar para la generación del conocimiento científico. (Groot *et al.*, 1998; Baek y Kenerley, 1998; Schuster *et al.*, 2012; Magaña-Ortíz *et al.*, 2013).

2.6 Transformación genética de hongos

Actualmente, para muchos hongos filamentosos de todos los taxones se han desarrollado técnicas para su transformación mediada por ADN. Entre las que se encuentran la transformación de protoplastos con polietilenglicol (PEG)-CaCl₂, electroporación, balística biológica, ondas de choque y usando *Agrobacterium tumefaciens* (Baek y Kenerley, 1998; de Groot *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2007; Schuster *et al.*, 2012; Magaña-Ortíz *et al.*, 2013). No obstante, la generación de protoplastos es una de las técnicas más utilizadas en hongos para la introducción de ADN exógeno. Los protoplastos son obtenidos mediante la incubación de germínulas con enzimas líticas que degradan la pared celular bajo un soporte osmótico estable, y en estas condiciones es cuando se puede insertar construcciones de ADN exógeno mediante diferentes tratamientos como PEG-CaCl₂ (Case, 1979; Peberdy, 1989), liposomas (Radford *et al.*, 1981), electroporación (Ward *et al.*, 1989; Goldman *et al.*, 1990).

Otros métodos como la transformación mediante el tratamiento con acetato de litio (Bej y Perlin, 1989), electroporación y la biobalística (Bailey *et al.*, 1993) son métodos que no requieren la degradación de la pared celular del hongo. En todas estas técnicas es necesario utilizar algún marcador de selección para la rápida identificación de las transformantes en medios selectivos.

2.7 Marcadores de selección

La transformación genética con secuencias homologas tiene una gran ventaja entre los métodos de transformación debido a que un gen de interés puede ser remplazado de manera específica en el genoma del hongo, por un marcador de selección, sin generar ruido en el fondo genético fúngico (Baek y Kenerley, 1998). Esta técnica ha sido aplicada para la eliminación dirigida de genes y se ha implementado como una manera de generar mutantes en varios modelos de hongos filamentosos, *amyB* en *A. oryzae*, (Tsuchiya *et al.*, 1992), *brm1* en *Alternaria alternata* (Shiotani y Tsuge., 1995), *nia* en *F. oxysporum* (Diolez *et al.*, 1993), *niaD* en *Gibberella fujikuroi* (Tudzynski *et al.*, 1996), *arg2* en *N. crassa* (Luo y Sachs, 1996), y *facA* en *Penicillium chrysogenum* (Gouka *et al.*, 1993). Los genes utilizados como marcadores de selección en hongos filamentosos se pueden ordenar como: **marcadores nutricionales**, ejemplos *suc1* (sacarosa), *amdS* (acetamida), *acuD* (acetato), *prn* (prolina), *qutE* (ácido quínico) y *pkiA* (sacarosa); **marcadores auxótrofos**, ejemplos *argB* (ornitina transcarbamilasa), *riboB* (riboflavina) *adeA* (fosforribosilaminoimidazol) *adeB* (succinocarboxamida sintasa), *trpC* (trifuncional enzima de síntesis triptofano) y *hemA* (5-aminolevulinate sintasa); **marcadores auxótrofos bidireccionales**, ejemplo *pyr2* (orotato fosforibosiltransferasa), *pyr4* (orotidin 5- fosfato descarboxilasa), *hxx1* (hexoquinasa), *acuA* (acetil CoA sintasa), *niaD* (nitrato reductasa) y *sC* (ATP sulfurilasa); y **marcadores de resistencia a drogas** ejemplo *bar* (resistencia a fosfofinotricina), *ble* (bleomicina- feleomicina), *ben* (benomil), *ptrA* (piritiamina) y *hph* que codifica la higromicina fosfotransferasa que le confiere resistencia a higromicina en hongos (Prabha y Punekar, 2004; Derntl *et al.*, 2015). También puede usarse genes reporteros como la Green fluorescent protein (GFP), mediante la inserción del gen *egfp*, para la identificación de transformantes aunque requiere de escrutinios más complejos (Guangtao *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2011).

Para el estudio de genes de interés en el género *Trichoderma* la técnica principalmente utilizada es la inserción de ADN exógeno mediante vectores que,

incluyen marcadores de selección que, proporcionan resistencia a los antibióticos; generalmente es usado el gen *hph* de *Escherichia coli*. La transformación genética se da mediante plásmidos o casetes construidos mediante PCR, que incluyan la secuencia del gen que confiere resistencia a higromicina B flanqueada por la región promotora 5' y la región terminadora 3' del gen de interés a investigar. De esta manera el gen de interés se ve reemplazado de manera específica mediante una doble recombinación homóloga, consecuentemente, las colonias capaces de crecer en un medio adicionado con higromicina son aquellas que lograron integrar el marcador de selección a su genoma y reemplazar el gen de interés, como ha sido previamente demostrado en diversas publicaciones (Zeilinger, 2004; Casas-Flores *et al.*, 2004; Aghcheh *et al.*, 2013; Castellanos *et al.*, 2010; Velázquez- Robledo *et al.*, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de las técnicas de transformación genética en hongos ha comenzado a expandir el potencial genético de *Trichoderma* spp. para aplicaciones industriales y agrícolas. Por lo tanto, es importante desarrollar diversas herramientas moleculares necesarias para realizar genómica funcional en *T. atroviride* que potencie la generación de conocimiento mediante la exploración de su genoma. Aunque existen varios marcadores de selección, no todos son eficientes y los antibióticos como la higromicina B son de un costo elevado.

Una manera de evitar los problemas y contratiempos ya mencionados es la generación de cepas auxótrofas a aminoácidos, en las que se utiliza el mismo gen afectado se implementa como un marcador de selección (Baek y Kenerley., 1998; Jin *et al.*, 2004; Magliano *et al.*, 2011). Esta estrategia resulta más económica y segura, debido a que se evita el uso de antibióticos.

IV. HIPÓTESIS

Usando un casete que porta resistencia a higromicina B para eliminar el gen *arg2* por doble recombinación homóloga, será posible generar cepas auxótrofas en *T. atroviride* a arginina y se podrá establecer como un marcador de selección.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Generar mutantes auxótrofos a arginina de *Trichoderma atroviride* mediante una estrategia novedosa de reciclaje del marcador de selección.

5.2 Objetivos específicos

-Obtener mutantes auxótrofos de *Trichoderma atroviride* mediante la eliminación específica del gen *arg2*.

-Determinar el tamaño mínimo del gen *arg2* para usarse como un marcador de selección mediante la complementación de mutantes auxótrofos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de mutantes auxótrofos a arginina

6.1.1 Cepas y condiciones de cultivo

La cepa de *T. atroviride* IMI 206040, fue usada como cepa silvestre (WT), para generar las mutantes auxótrofos a arginina en este trabajo mediante la eliminación del gen *arg2* ($\Delta arg2$). Para la propagación de las cepas se utilizó medio Papa Dextrosa Agar (PDA; DIFCO) incubado a 27°C. Para la obtención de las mutantes carentes del gen *arg2*, las transformantes fueron seleccionadas en medio mínimo (0.2 g MgSO₄ + 7H₂O, 0.2 g KCl, 0.9 g K₂HPO₄, 1 g NH₄NO₃, 2 mg FeSO₄ + 7H₂O, 2 mg ZnSO₄ + 7H₂O, 2 mg MnCl₂ + 7H₂O, 20 g Glucosa, 20 g agarosa, pH ajustado a 5.5, para un litro de medio mínimo) suplementado con higromicina B (100 µg/mL) y 50mM de L- arginina. Todos los medios de cultivo previamente se esterizaron, usando autoclave a 15 libras por pulgada, durante 15 minutos, la manipulación de los medios PDA y medio mínimo (MM) así como el de las cepas de hongos se realizó bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

6.1.2 Análisis *in silico* del gen *arg2*

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la sub-unidad pequeña de la CFS-A de *T. virens* (código GeneBank AAB58299.1) a partir de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>). Con esta secuencia de aminoácidos se realizó un BLASTp en la base de datos del genoma de *T. atroviride* (<http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>), usando los siguientes parámetros, base de datos utilizada-*Trichoderma atroviride* v2.0 *Gene Catalog (proteins)*, *Expect Value* = 1.0E-5 y usando el filtro de regiones de baja complejidad. De esta manera se obtuvo la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la sub-unidad pequeña CFS de *T. atroviride*, incluyendo 5000 pb de secuencia tanto rio

arriba como también río debajo de la región codificante del gen *arg2*, con el objetivo de identificar genes que se encuentran en esta región.

6.1.3 Diseño de oligonucleótidos para la eliminación del gen *arg2* por PCR

La eliminación de la región codificante del gen *arg2* se realizó por doble recombinación homóloga en *T. atroviride* con un casete que se construyó mediante PCR de doble unión como se ha descrito previamente (Davidson *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2004). La estrategia permite la generación de mutantes carentes del gen *arg2* de forma rápida y específica.

Utilizando el programa bioinformático OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), se diseñaron cinco pares de oligonucleótidos (Tabla 1), con base a la secuencia de nucleótidos del gen *arg2* que codifica la subunidad pequeña de la CFS de *T. atroviride*. El par de oligonucleótidos Parg2-F y PQarg2-R (Tabla 1) fue diseñado para amplificar 1,416 pb de la región promotora y el par TQarg2-F y Targ2-R (Tabla 1) para amplificar 1,421 pb de la región terminadora del gen *arg2* (Figura 3). Además, los oligonucleótidos Hyg-F y Hyg-R (Tabla 1) se usaron para amplificar 1,397 pb del marcador de selección *hph* (Figura 3). En esta estrategia, se diseñaron dos oligonucleótidos quiméricos (PQarg2-R y TQarg2-F) que incluyen secuencias de empalme que son complementarias a los extremos 5' y 3' del gen *hph* con el objetivo de realizar la fusión de los fragmentos 5' y 3' del gen *arg2* con el gen *hph* por PCR. Finalmente, se diseñaron oligonucleótidos anidados N5arg2-F y N3arg2-R para amplificar el casete producto de los fragmentos fusionados por PCR (Tabla 1; Figura 3).

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para la generación de cepas auxótrofas a arginina

Pareja	Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos 5' → 3'	Secuencia blanco
1	Parg2-F	GCAAGGTTGAGGATGTGGATGG	Promotor de <i>arg2</i>
	PQarg2-R	TGCTCCTTCAATATCAGTTAACGTCGATCAG TTTGTCTTGGTCACGGGTGG	Promotor de <i>arg2</i>
2	TQarg2-F	CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG AGGATAACCGGCCAGCCAG	Terminador de <i>arg2</i>
	Targ2-R	GTGAACGTGAGCGAGAGCG	Terminador de <i>arg2</i>
3	Hyg-F	GATCGACGTAACTGATATTGAAGGAGCA	Gen <i>hph</i>
	Hyg-R	CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGG	Gen <i>hph</i>
4	N5arg2-F	GCAATTATGGCTTCCTTGGTGC	Promotor <i>arg2</i> (anidado)
	N3arg2-R	GATGCCTCCACCACCCACG	Terminador <i>arg2</i> (anidado)
5	ORFarg2-F	CCTCTCTTCTTCTTCTCTCTCCATC	ORF de <i>arg2</i>
	ORFarg2-R	CCCCAACTCTACATCTTTCCTC	ORF de <i>arg2</i>

6.1.4 Eliminación del gen *arg2* por PCR

La estrategia de PCR doble unión consta de tres rondas de PCR como se describe enseguida. En la primera ronda de PCR se amplificaron por separado 1,416 pb de la región promotora (extremo 5'), 1,421 pb de la región terminadora (extremo 3') del gen *arg2* y 1,397 pb del gen seleccionable *hph* con las parejas de oligonucleótidos Parg2-F con PQarg2-R, TQarg2-F con Targ2-R y Hyg-F con Hyg-R, respectivamente (PCR-1 en la Figura 3).

En una segunda ronda de PCR, los fragmentos del promotor y terminador del gen *arg2*, se fusionaron con el marcador de selección *hph* usando relaciones molares 1:1:3, respectivamente (Figura 3). Para esto a los oligonucleótidos PQarg2-R y TQarg2-F se les adicionaron secuencias de empalme en los extremos, de manera que en el segundo PCR los fragmentos funcionen como oligonucleótidos

para que la *Taq* ADN polimerasa fusione por síntesis los extremos 5' y 3' del gen *arg2* con los extremos del gen *hph* (Figura 3).

Un tercer PCR se llevó a cabo utilizando la pareja de oligonucleótidos anidados N5arg2-F y N3arg2-R y como ADN templado el producto de la ronda de PCR 2 (Figura 3) para generar una construcción con un tamaño teórico de 4,150 pb. Esto para obtener más producto de PCR, así también para generar fragmentos más cortos y específicos del casete utilizado para eliminar el gen *arg2* mediante la transformación genética.

En cada una de las reacciones de PCR se utilizó la enzima *Taq* ADN Polimerasa *High Fidelity* (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del proveedor. El programa utilizado en el termociclador para los PCRs fue: un paso inicial de 3 minutos a 95°C, 35 ciclos comprendiendo 3 pasos a 95°C por 20 segundos (desnaturalización del ADN), 60°C por 20 segundos (hibridación del cebador) y 68°C durante 1 minuto por cada 1000 pb (polimerización). Las reacciones de PCR finalizaron con 5 minutos a 68°C.

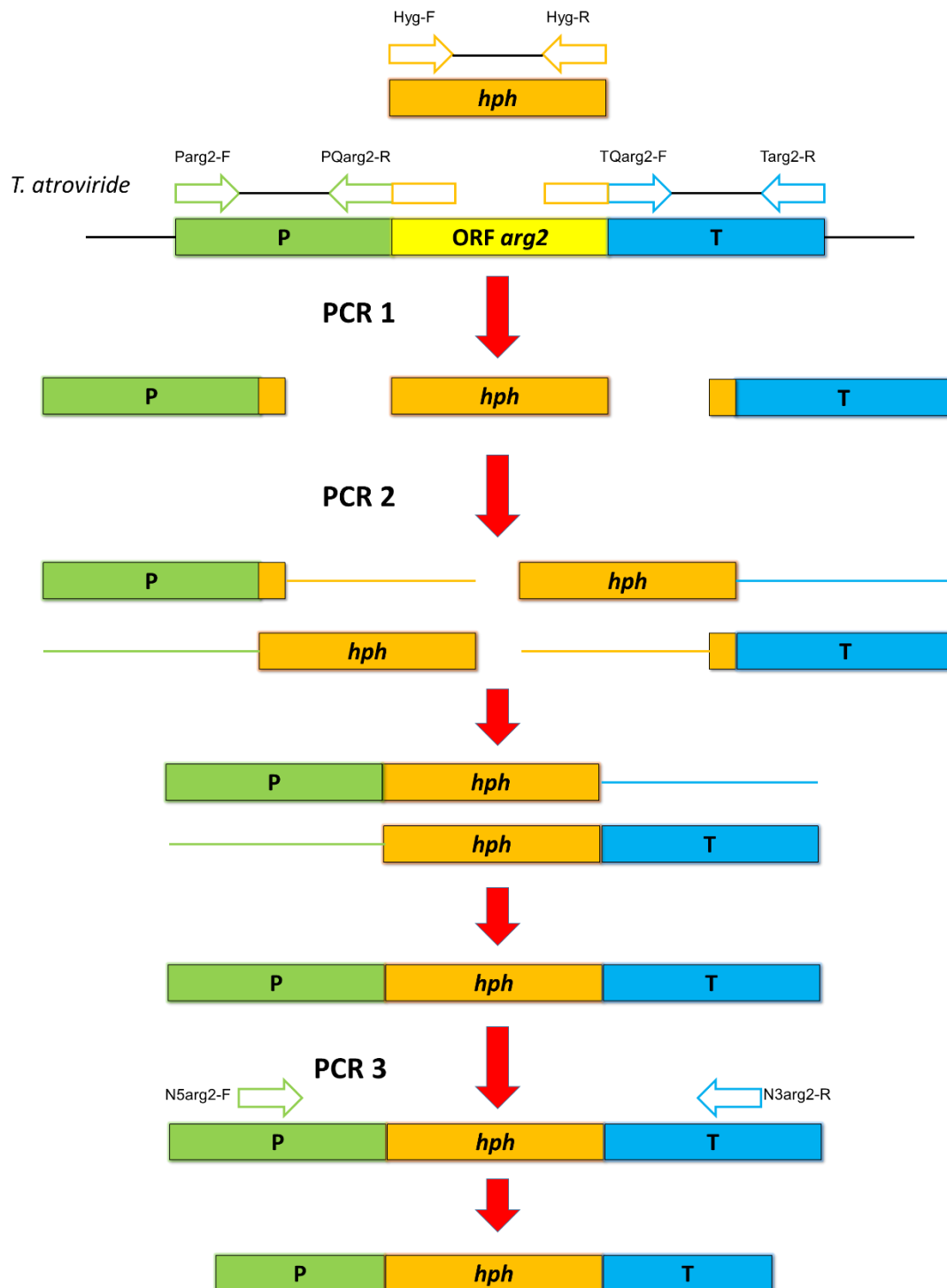


Figura 3. Técnica de PCR doble unión para construir el casete carente de la región codificante del gen *arg2*. PCR 1, amplificación de la región promotora (P) y terminadora (T) excluyendo el marco de lectura, así como también se amplió el gen de resistencia *hph*. PCR 2, fusión de los tres fragmentos mediante las regiones de empalme en los oligonucleótidos quiméricos (PQarg2-R y TQarg2-F) agregadas en el PCR 1. PCR 3, amplificación del casete completo usando los oligonucleótidos N5arg2-F y N3arg2-R, con el principal objetivo de aumentar su concentración y especificidad.

6.1.5 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados, en columnas individuales, con el kit “*QIAquick PCR Purification Kit*” de QIAGEN mediante el protocolo suministrado por el fabricante.

6.1.6 Transformación de protoplastos para la eliminación de *arg2* por el método de polietilenglicol

Se inocularon 1×10^8 conidios de la cepa WT por cada 100 mL de medio GEYEC (1.5% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura%, 0.5% de polipeptona) y los cultivos se incubaron durante 18 horas a 27°C en agitación orbital constante a 160 revoluciones por minuto (rpm). El micelio se filtró usando un embudo con tela “magitel” y se lavó con agua destilada estéril. El micelio se colectó con una espátula metálica (todo el material previamente esterilizado) y se pesaron 0.2 gramos de micelio para cada reacción de generación de protoplastos. El micelio se colocó en un tubo Falcón de 50 mL con 7 mL de solución osmótica (50 mM de CaCl_2 , 0.5 M de Manitol, 50 mM de Ácido 2-N-morfolino etanosulfónico (MES); el pH se ajustó a 5.5 con KOH) y 0.1 gramos de enzima lítica que degrada la pared celular de los hongos (*Trichoderma harzianum*, SIGMA). Se mezcló vigorosamente en un vórtex hasta dispersar completamente el micelio en el extracto enzimático. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación orbital a temperatura ambiente durante 3 horas, hasta observar la formación de protoplastos en un microscopio Leica DM500. Los protoplastos se filtraron usando un filtro “Miracloth” doble acoplado y posteriormente se lavó el filtro con 2 mL de solución osmótica para mejorar la recuperación de protoplastos. Cuidadosamente la suspensión de protoplastos se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL y los protoplastos se recuperaron centrifugando a 9,600 g durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla de protoplastos se resuspendió con el volumen mínimo necesario de solución osmótica (300 μL por muestra). Los protoplastos se cuantificaron en un microscopio Leica DM500 usando una cámara de Neubauer.

Las transformaciones se realizaron con 300 μL de una suspensión de protoplastos (entre 10^7 - 10^8 / mL de protoplastos) que se mezclaron con 100 μL (50 μL de DNA más 50 μL de solución osmótica) de la construcción obtenida en el PCR 3 (5-10 μg) para la eliminación del gen *arg2*. Como control de transformación, 300 μL de la suspensión de protoplastos se trataron con 100 μL de solución osmótica (sin ADN). Las mezclas se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. Después, a la mezcla se le agregaron 400 μL de PEG 4000, diluido al 40% con solución osmótica y precalentada a 42 ° C. La mezcla de transformación se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los protoplastos se mezclaron suavemente con PDA suave (medio PDB adicionado con 0.7% de agar bacteriológico, 1 M de sorbitol más 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina) y finalmente la mezcla se vertió en placas de PDA suplementado con 1 M de sorbitol más 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina. Los cultivos se incubaron a 27°C hasta la observación de colonias resistentes a la higromicina (aproximadamente 5 días). Las transformantes resistentes al antibiótico se recuperaron para realizar tres cultivos monospóricos en MM complementado con higromicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 0.5% de L- arginina. Solo se seleccionaron las colonias capaces de reemplazar correctamente el gen *arg2* por el gen *hph*. Figura 4.

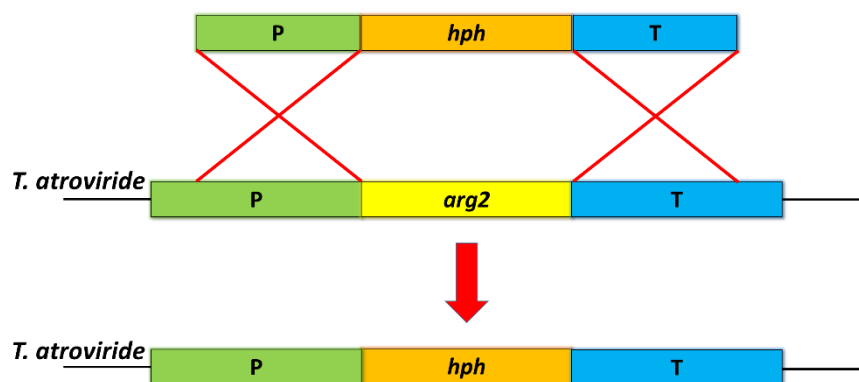


Figura 4. Reemplazo del gen *arg2* por el marcador de selección *hph* mediante doble recombinación homóloga en *T. atroviride*. Una vez que el casete que contiene el marcador de selección *hph* entra en la célula, las secuencias homólogas al genoma (regiones promotora y terminadora de *arg2*, en verde y azul respectivamente) van a guiar el reemplazo génico en *T. atroviride* mediante una doble recombinación homóloga, consecuentemente ocasionando el reemplazo específico del gen *arg2* por el marcador seleccionable *hph*.

6.1.7 Pruebas de auxotrofia para identificar mutantes carentes del gen *arg2*

Después de realizar el tercer cultivo monospórico, los conidios de las cepas resistentes a higromicina se colectaron. La colecta se realizó agregando a las colonias 2 mL de agua destilada estéril y resuspendiendo los conidios por fricción con una asa metálica esterilizada con fuego. Los conidios se cuantificaron al microscopio usando una cámara de Neubauer y se usaron gotas de 5 μ L con una densidad de 100 conidios/ μ L para inocular MM y MM suplementado con 50mM de L- arginina.

Las cepas mutantes incapaces de crecer en MM y que solo pudieron crecer en MM suplementado con L- arginina fueron seleccionadas para confirmar mediante PCR el remplazo del gen *arg2*.

6.1.8 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio crecido en oscuridad sobre placas de medio de cultivo PDA con 50mM de L- arginina y cubierto con papel celofán. Para esto los cultivos se incubaron durante 48 horas a 27°C, el micelio se recuperó con una espátula metálica y se congeló en Nitrógeno líquido.

El micelio se molió en un mortero con N₂ líquido (mortero previamente esterilizado) hasta obtener un polvo fino. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 500 μ L de micelio molido, después se le agregaron 600 μ L de la solución de extracción (7 M de Urea, 0.35 M NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA y 1% de N-Lauril Sarcosina) y se mezcló en vórtex durante dos minutos. Posteriormente, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se le agregaron 600 μ L de Fenol- Cloroformo- Alcohol isoamílico (50:48:2) y se mezcló en vórtex por 10 minutos. Subsecuente, se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante (la fase acuosa) se recuperó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL y nuevamente se repitieron los

pasos desde agregar los 600 μ L de Fenol- Cloroformo- Alcohol isoamílico, hasta nuevamente recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 mL. Para precipitar el ADN genómico se adicionó un volumen de isopropanol y se mezcló por inversión de 5 a 8 veces. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14,400 g durante diez minutos. El sobrenadante se desechó, cuidando de no perder la pastilla de ADN formada al fondo del tubo, y se agregó a cada tubo 500 μ L de etanol al 70% para lavar la pastilla con la finalidad de eliminar sales. Los tubos se mezclaron en vórtex y nuevamente se centrifugaron a 14,400 g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y los tubos con la pastilla del ADN se colocaron boca abajo sobre papel absorbente hasta secar la pastilla. El ADN se re-suspendió con 100 μ L de agua HPLC estéril.

Por cada muestra se agregó 1 μ L de RNAsa (1 mg/mL, Invitrogen) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se analizó la integridad del ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% más bromuro de etidio. Para esto, las muestras de ADN genómico una vez separadas se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

6.1.9 Identificación de mutantes auxótrofas por PCR

Las mutantes auxótrofas se identificaron mediante reacciones de PCR usando oligonucleótidos específicos para determinar los remplazos génicos, que comprende de un oligonucleótido fuera del casete y otro dirigido al marcador de selección *hph*, para demostrar que el gen de *arg2* fue remplazado por el marcador de selección.

Los pares de oligonucleótidos Parg2-F y Hyg-R se usaron para amplificar la región promotora del gen *arg2* con el gen *hph* (Figura 5) con un tamaño teórico de 2,828 pb. Para una segunda comprobación se usaron los oligonucleótidos Hyg-F y Targ2-R para amplificar el gen *hph* con la región terminadora del gen *arg2* (Figura 5) con un tamaño teórico de 2,916 pb, utilizando en ambos casos la cepa

WT como control negativo. Cabe mencionar que estas combinaciones de oligonucleótidos solo quedarán en fase y amplificarán en mutantes auxótrofos que han perdido el gen *arg2* por reemplazo con el gen seleccionable *hph* (Figura 5). Las reacciones de PCR se realizaron usando la enzima Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. El programa del termociclador fue de la siguiente manera: un paso inicial de 3 min a 95°C, seguido por 35 ciclos que comprendieron los siguientes pasos: 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 3 min a 72°C. Las reacciones finalizaron con un paso de 5 min a 72°C. Los amplicones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

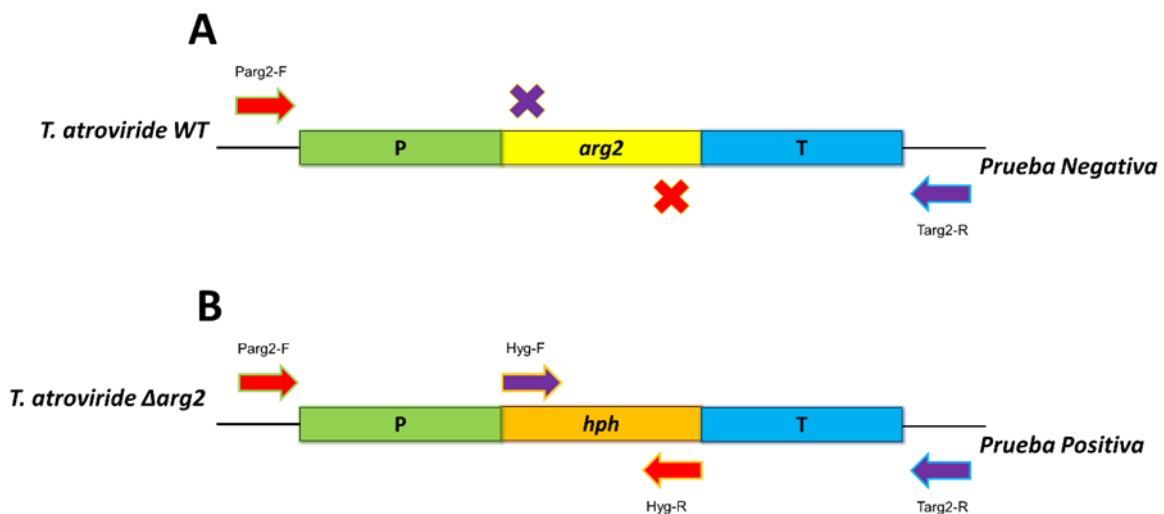


Figura 5. Oligonucleótidos usados para la identificación molecular de mutantes auxótrofos. (A) La cepa WT se utilizó como control negativo ya que al carecer del marcador de selección *hph* no existen secuencias complementarias para los cebadores Hyg-F y Hyg-R; por lo tanto no debe haber amplificación cuando se combinan con Targ2-R o Parg2-F, respectivamente. (B) En las mutantes $\Delta arg2$ donde ocurrió el reemplazo génico los oligonucleótidos Parg2-F y Hyg-R (flechas rojas) quedarán en fase y si presentarán la amplificación de un fragmento de 2,828 pb. Lo mismo aplica para los oligonucleótidos Hyg-F con Targ2-R (flechas moradas) amplificarán un fragmento de 2,916 pb.

6.2 Caracterización fenotípica de mutantes auxótrofos $\Delta arg2$

6.2.1 Determinación de la concentración mínima de L- arginina que restaura la auxotrofia

Para determinar la concentración mínima de L- arginina que restaura la prototrofia en las mutantes carentes del gen *arg2* ($\Delta arg2$), se analizó el crecimiento de las cepas $\Delta arg2$, usando MM suplementado con concentraciones crecientes de L- arginina (0.5 mM, 1 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM). Los medios de cultivo se inocularon en la parte central con 5 μ L de esporas (2500 conidios) y se incubaron a 28°C en una cámara iluminada con luz blanca, se estableció como control la cepa WT creciendo en MM sin L- arginina. Se tomaron fotografías cada 24 horas durante 5 días a las colonias junto con una referencia de medida y la determinación del crecimiento se realizó usando el programa informático *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>). El experimento se realizó por triplicado.

6.2.2 Producción de conidios estimulada por la luz

Para determinar la producción de conidios estimulada por la luz en las cepas WT y $\Delta arg2$, se generaron precultivos inoculando los medios de cultivo en la parte central con 1 μ L de conidios (500 conidios/ μ L). Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento a 27°C durante 48 h. Del borde de crecimiento de la colonia se cortaron discos de micelio, se inocularon por triplicado en el centro de la placa de MM suplementada con 50mM de L- arginina para las cepas $\Delta arg2$ y MM sin L- arginina para la cepa WT. Posteriormente, se crecieron en dos condiciones, luz blanca y oscuridad (control). Después de 7 días se colectaron los conidios de las cepas crecidas en luz con 10 mL de agua destilada estéril y se realizaron diluciones (10^{-2}) para determinar la concentración de conidios en cada cepa. Finalmente, los conidios se cuantificaron en un microscopio óptico Leica DM500 usando una cámara de Neubauer.

6.2.3 Daño mecánico

De preinóculos crecidos en medio de cultivo PDA en oscuridad durante 48 horas para la cepa WT y PDA complementado con 50mM de L- arginina para las cepas $\Delta arg2$, se cortaron discos de micelio del borde de crecimiento de la colonia, se inocularon por triplicado en el centro de la placa de MM suplementada con 50mM de L- arginina para las cepas $\Delta arg2$ y MM sin L- arginina para la cepa WT como control. Después de 36 horas de crecimiento en oscuridad a 27°C se le hicieron cortes con bisturí con el mismo patrón, en un cuarto oscuro con luz roja de seguridad. Después de generar el daño se volvieron a incubar a 27°C en oscuridad por 48 horas. Finalmente se observó y tomaron fotografías sobre la producción de conidios inducidos por daño mecánico.

6.3 Complementación de la auxotrofía

6.3.1 Construcción de casetes para la complementación de la auxotrofía

Para la complementación de la auxotrofía se generaron fragmentos de diferentes tamaños del gen *arg2*. Usando el programa OlicoCalc se diseñaron seis parejas de oligonucleótidos (Tabla 2) para generar versiones cortadas del gen *arg2*. En la Figura 6, se muestran los fragmentos más cortos tanto río arriba como río abajo del marco de lectura.

La generación de los casetes se hizo por PCR usando la enzima *Taq* ADN Polimerasa Recombinante (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron con 100 ng de ADN genómico de la cepa WT, utilizando los pares de oligonucleótidos para cada reacción. Las reacciones se realizaron a cabo individualmente con la misma programación de termociclador. El programa del termociclador fue: paso inicial de 95°C por 3 min, 40 ciclos formados por: 95°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, 72°C por 4 min y un paso final a 72°C durante 5 min.

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para construir diferentes versiones del gen *arg2* que complementen la auxotrofia.

Pareja	Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos 5'- 3'	Tamaño de Casete
1	Parg2-F 1200	GGGCGCATCTTCAGAGTTGG	3846 pb
	Targ2-R 1200	CCACTACACTCGCGACAAGTCC	
2	Parg2-F 1000	CTGCCCCGGTAGAGTTGAGCTG	3451 pb
	Targ2-R 1000	CGACAGAGGAGTGATAGGTACC	
3	Parg2-F 800	CATAGAATAGGGCACAGGGGCC	3093 pb
	Targ2-R 800	CACCGCTAAGGAACGCGATTG	
4	Parg2-F 600	CTGACCCCTCCGATGCACC	2558 pb
	Targ2-R 600	CCATACAGGGCTGCCAACGG	
5	Parg2-F 400	CTTATGAACGGGCGCCCGTC	2244 pb
	Targ2-R 400	GGAACACGATTCTGGACCCGG	
6	Parg2-F 200	CTACAGGACTATCTCTCTGGTTTCG	1869 pb
	Targ2-R 200	GAGGCTCAGATGGAGACTGATG	

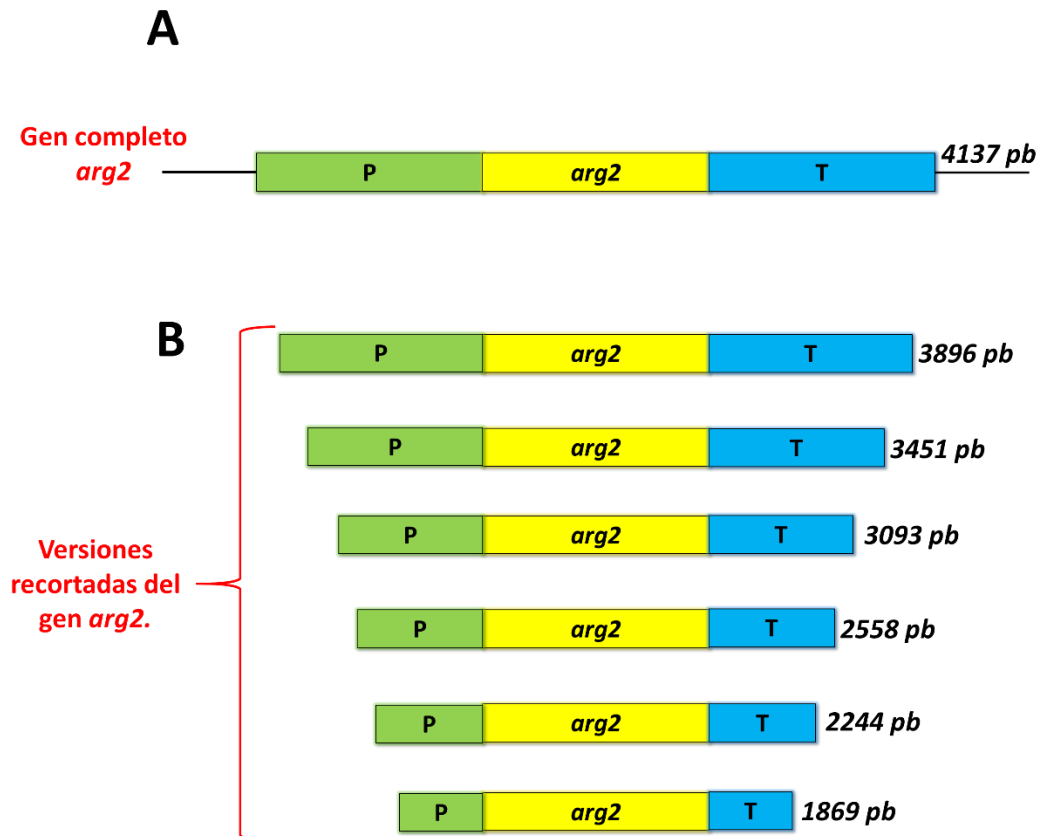


Figura 6. Versiones del gen *arg2* usadas para la prueba de complementación. (A) Gen completo *arg2*. El gen completo comprende un total de 4,137pb. **(B) Versiones recortadas del gen *arg2*.** Se generaron seis casetes con la región promotora (P) y terminadora (T) recortadas, esto para determinar el tamaño mínimo capaz de complementar la auxotrofia y por lo tanto, volviendo protótrofo nuevamente a las cepas $\Delta arg2$.

Finalmente los amplicones se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y posteriormente se purificaron mediante el kit *QIAquick PCR Purification Kit* de QIAGEN, siguiendo las especificaciones del proveedor.

6.3.2 Complementación de la auxotrofia a arginina con el gen *arg2*

Para obtener cepas complementadas con el gen *arg2* se realizaron transformaciones con cada una de las diferentes versiones generadas por PCR para el gen *arg2* (Figura 6-B), siguiendo la misma metodología ya descrita para la transformación de protoplastos. Se inocularon 1×10^8 conidios de *T. atroviride* $\Delta arg2$

por cada 100 mL de medio GEYEC (1.5% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de polipeptona) suplementado con 50mM de L- arginina, e igualmente se incubo durante 18 horas a 27°C en agitación orbital constante (160 rpm). Todos los pasos para la transformación de protoplastos se mantiene íntegros hasta el la mezcla de protoplastos con el PDA suave; como previamente descrito aquí. A partir de aquí los medios ricos (PDA y PDB) fueron remplazados por MM suave (adicionado con 0.7% de agarosa, sustituye el agar bacteriológico, 1 M de sorbitol). Controles fueron con MM suave suplementado con L- arginina (Control Positivo) y MM suave sin L- arginina y sin ADN (Control Negativo). Además, las transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en placas de MM suplementado solo con 1 M de sorbitol.

Después de 5 días de incubación a 27°C las colonias individuales que lograron crecer en MM sin L- arginina con 1M de sorbitol fueron recuperadas e inoculadas en MM mínimo sin L- arginina adicionado con 0.7% de agarosa. Después de tres cultivos monospóricos en MM, las cepas fueron inoculadas en medio PDA y crecidas en condiciones de oscuridad a 27°C para la generación de preinóculos.

6.3.3 Identificación molecular de las cepas complementadas mediante PCR

Según el protocolo ya descrito las cepas fueron inoculadas en medio PDA con celofán y se extrajo ADN con el procedimiento ya detallado. La complementación con el gen *arg2* en las cepas auxótrofas se comprobó mediante PCR usando los oligonucleótidos específicos para detectar el gen *arg2*. Oligonucleótidos utilizados Parg2-F-200 (Tabla 2) con ORFarg2-R (Tabla 1) tamaño teórico 1,686 pb y ORFarg2-F (Tabla 1) combinado con Targ2-R-200 (Tabla 2) con un tamaño teórico de 2,231 pb.

6.3.4 Pruebas de complementación fenotípica

Para corroborar que las cepas *arg2⁺* se comportan como la cepa WT, se llevó a cabo el análisis de producción de esporas, respuesta a daño mecánico, la metodología que se siguió es la ya descrita para cada una de las pruebas, omitiendo la L- arginina en MM. Se realizó prueba generación de esporas por pulso de luz azul. Para la prueba de pulso de luz se generaron preinóculos en placas de PDA para la cepa WT y las cepas complementantes, se dejaron crecer en oscuridad durante 48 horas a 27°C. Se cortaron discos del borde de crecimiento de la colonia y se inocularon por triplicado en MM, todo el tiempo en un cuarto oscuro con luz de seguridad roja. Posteriormente se incubó en oscuridad a 27°C durante 36 horas. Después se dio un pulso de 5 minutos con luz azul en cuarto oscuro con luz roja de seguridad. Posteriormente, los cultivos se volvieron a incubar durante 48 horas en oscuridad a 27°C. Finalmente, se observó y tomaron fotografías de las colonias para analizar la producción de conidios inducidas por el pulso de luz.

6.4 Análisis estadístico

Las gráficas muestran las medias de tres experimentos independientes y la desviación estándar determinada mediante el programa Office Excel 2013. Para los análisis de medias, se realizaron pruebas ANOVA de una vía utilizando los Post-Test de Tukey con valores α 0.05. Estas pruebas se llevaron a cabo en el programa *GraphPad Prism* (<http://www.graphpad.com/>).

VII. RESULTADOS

7.1 Obtención de mutantes auxótrofos a arginina

7.1.1 Identificación del gen *arg2* en *Trichoderma atroviride*

De la base de datos se identificó el gen *arg2* (ID 148882) que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad pequeña de la proteína CFS-A de *T. atroviride*.

Se obtuvo la secuencia del marco de lectura abierto del gen *arg2* además de 5000 pb rio arriba y rio abajo del ORF y se identificaron los genes colindantes así como su orientación respecto a *arg2*. Esto para asegurar que solamente es un solo gen el que representa el *locus* donde se encuentra el gen *arg2* (Figura 7).

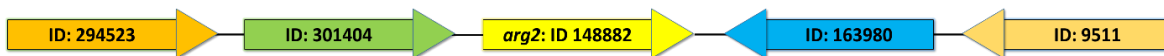


Figura 7. Locus de *arg2*. Además de la secuencia ORF de *arg2* se analizó la secuencia 5000 pb rio arriba y rio abajo. Se encontraron 4 genes más (ID de la base de datos de *T. atroviride* incluida), que al no estar en la misma ubicación o mostrar solapamiento sobre el gen de interés *arg2*, se procedió a diseñar los cebadores para construir el casete para el remplazo genético.

7.1.2 Construcción del casete para la eliminación de *arg2*

Las construcciones obtenidas del PCR1 representados en la Figura 8 muestran que los productos de las reacciones de PCR son específicos puesto que se amplificó en cada reacción solo una banda de ADN, PCR1-H que muestra el tamaño teórico esperado de 1,397 pb que corresponde al fragmento del gen *hph*, PCR1-P con un tamaño 1,416 pb correspondiente a la región promotora del gen *arg2* y PCR1-T con un tamaño de 1,421 pb que corresponde a la región terminadora del gen *arg2* (Figura 8).

El PCR2 fusión de los fragmentos 5' y 3' del gen *arg2* con el gen *hph*, los fragmentos fusionados no muestran bandas claras debido a que la polimerasa fusiona los fragmentos por síntesis, generando bandas discretas de diferente tamaños.

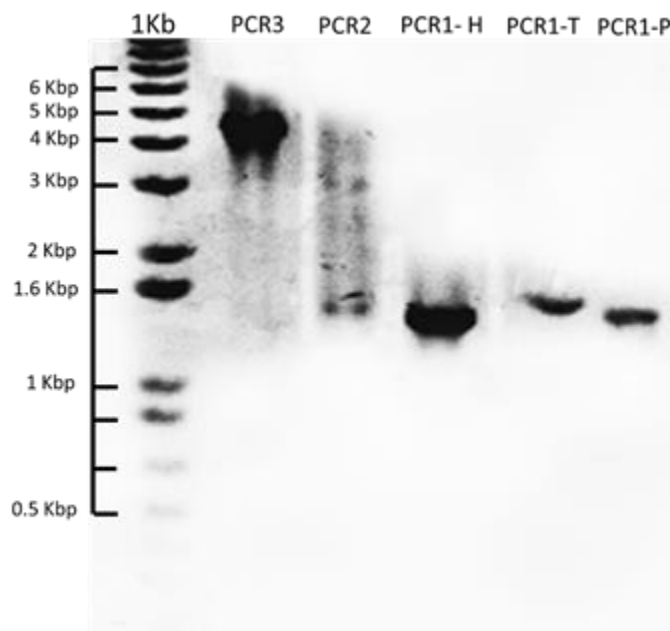


Figura 8. Construcción del casete para el remplazo del gen *arg2*. PCR1-P, Fragmento de la región 5' (1,416 pb) del gen *arg2*. PCR1-T, Fragmento de la región 3' (1,421 pb) del gen *arg2*. PCR1-H, gen *hph* (1,397 pb). PCR2, reacción para fusionar los fragmentos generados en el PCR1. PCR3, Amplificación del casete $\Delta arg2$ (4,137 pb). Para estimar los tamaños moleculares de los productos de PCR se usó el marcador de peso molecular 1 kb de Invitrogen.

El PCR3 amplificó el casete completo, obteniendo una versión más pequeña de la construcción, esto para aumentar la especificidad, además para obtener una mayor concentración del casete, la banda observada coincide con el tamaño teórico esperado de 4,150 pb (Figura 8).

7.1.3 Transformación de protoplastos de *Trichoderma atroviride* para la eliminación de *arg2*

Las transformantes de seleccionaron por resistencia al antibiótico y solamente los protoplastos que se incubaron con el casete obtenido en el PCR3

fueron capaces de desarrollar colonias resistentes a la higromicina B, sugiriendo que integraron el gen *hph* a su genoma (Figura 9-A). En el control negativo no se desarrolló ninguna colonia (Figura 9-B) debido a que los protoplastos no se les incluyó la construcción generada en el PCR 3, y fueron incapaces de sobrevivir, validando que los protoplastos crecidos PDA con higromicina B son cepas transformantes. El control positivo indica que la viabilidad de los protoplastos no se vio comprometida por proceso de transformación, ya que los protoplastos pudieron crecer en PDA de manera normal (Figura 9-C).

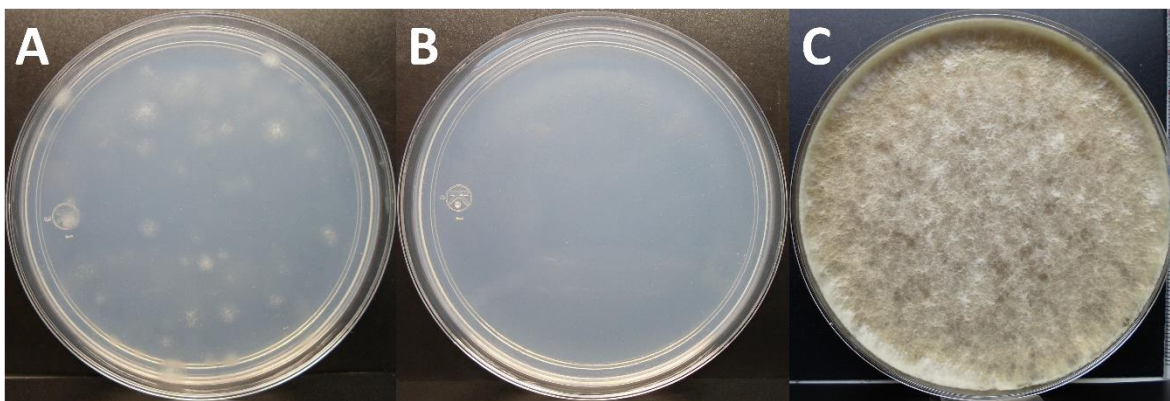


Figura 9. Transformación de protoplastos de *T. atroviride* con la construcción $\Delta arg2$. (A) **Transformación.** Colonias transformantes resistentes a higromicina obtenidas con la construcción que incluye el gen *hph*. (B) **Control Negativo.** Protoplastos sin incluir el casete $\Delta arg2$ del PCR3 fueron cultivados en PDA con higromicina y 1 M de sorbitol. (C) **Prueba de viabilidad.** Los protoplastos fueron cultivados en PDA con 1M de sorbitol y 50mM de L- arginina.

7.1.4 Identificación de transformantes auxótrofas

Se seleccionaron ocho cepas transformantes resistentes a higromicina y fueron sometidas a prueba de auxotrofia fenotípica, las cepas mostraron ser incapaces de crecer en MM simple como cabría de esperar de una cepa auxótrofa a arginina (Figura 10-A), en las ocho cepas mutantes auxótrofas se observó un crecimiento comparable a la cepa WT en placas de MM enriquecidos con L-arginina (Figura 10-B), comprobando que estas cepas mutantes auxótrofas necesitan el enriquecimiento del MM con L- arginina para poder desarrollarse con normalidad.

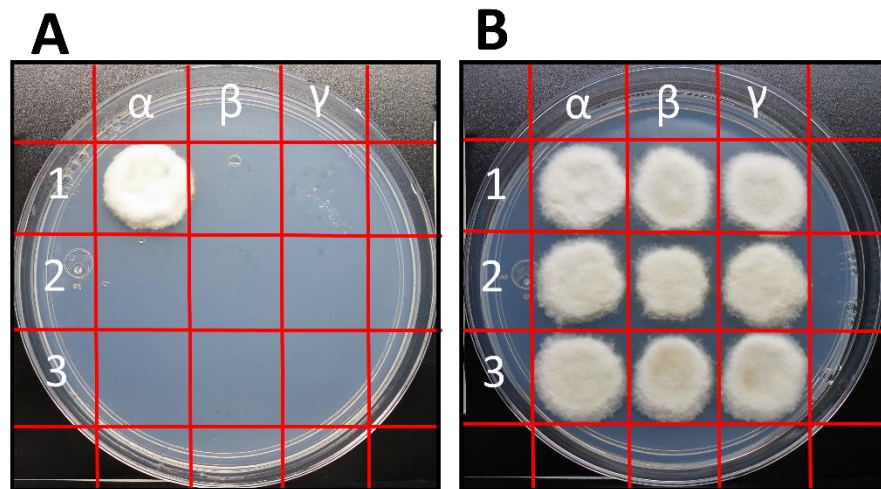


Figura 10. Prueba de auxotrofia fenotípica. (A) Placa de MM sin L- arginina **(B)** Placa de MM con 50mM de L- arginina. En el recuadro A1 α y B1 α fue inoculada la cepa WT como control. En cambio, todas las cepas incapaces de crecer en MM pero capaces de crecer en MM con L-arginina son mutantes auxótrofos.

7.1.5 Determinación del reemplazo génico en las cepas auxótrofas mediante PCR

Se seleccionaron cinco cepas mutantes que se identificaron mediante la prueba de auxotrofia fenotípica. Las reacciones de PCR son específicas para la amplificación del casete de *hph* y para comprobar que se reemplazó el gen *arg2* (Figura 11-A). Los fragmentos que se amplificaron mediante la reacción de PCR son las regiones 5' del ORF del gen *arg2* y el marco de lectura de *hph* que coinciden con el tamaño teórico de 2,828 pb (Figura 11-B) y la región 3' río abajo del ORF de *arg2* junto con el ORF de *hph* con un tamaño de 2,916 pb (Figura 11-C). Todas las mutantes auxótrofas $\Delta arg2$ presentaron la amplificación de una banda de ADN del tamaño esperado que no está presente en la cepa WT usada como control (Figura 11B-C).

Las reacciones de PCR con los oligonucleótidos Parg2-F más Hyg-R en las cepas $\Delta arg2$ muestran otros dos pares de bandas de un menor peso molecular que no corresponde al tamaño teórico del fragmento esperado (Figura 11-A), pero al

encontrarse presentes en el ADN de la cepa WT estos pequeños amplicones no representan ruido para determinar que las mutantes auxótrofas han perdido el gen *arg2* por reemplazo génico. Nuestros resultados indican que los fenotipos de auxotrofia coinciden perfectamente con la carencia del gen *arg2* y, por lo tanto, que estas cepas tienen reemplazado el gen *arg2* por el marcador de selección *hph*, que en el resto de este escrito llamaremos cepas $\Delta arg2$.

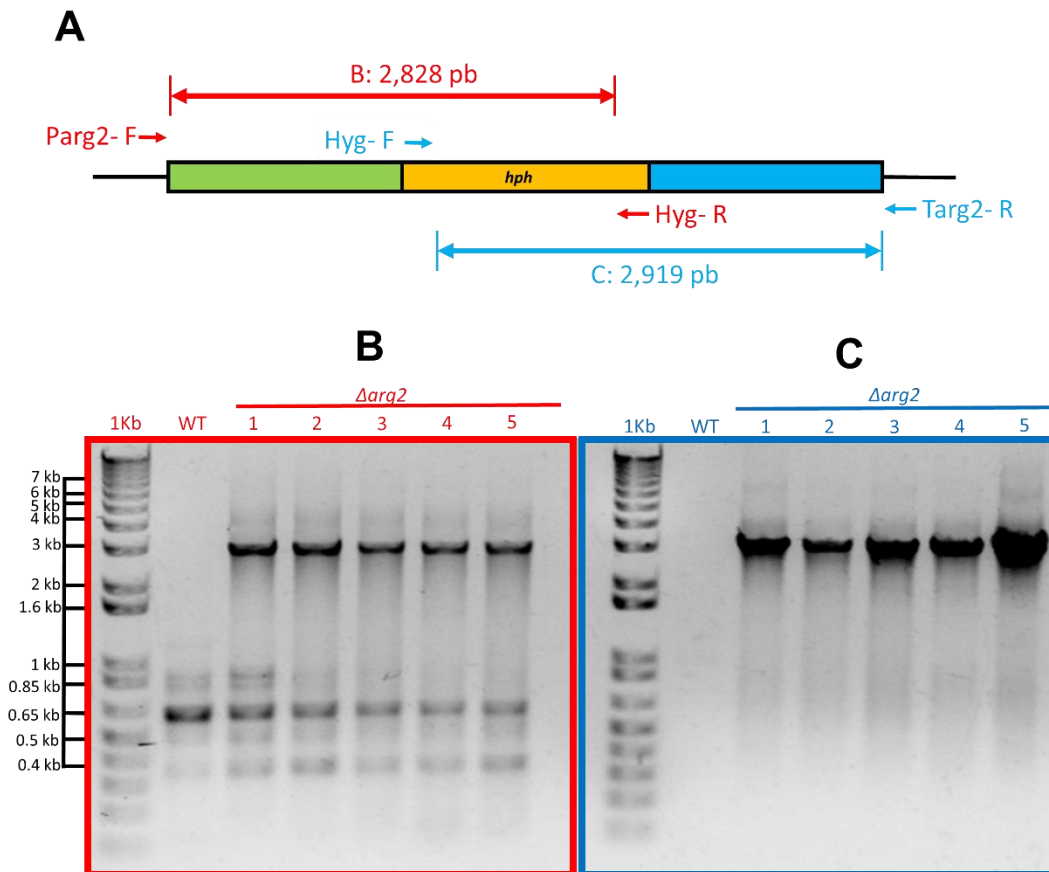


Figura 11. Identificación de mutantes auxótrofas por PCR. Se llevaron a cabo 2 reacciones de PCR que amplificaron; la región promotora del gen *arg2* con el gen *hph*. **(A)** Representación del casete $\Delta arg2$. **(B)** PCR de la región 5' usando los oligonucleótidos Parg2-F y Hyg-R, tamaño teórico 2,828 pb. **(C)** PCR de la región 3' utilizando la los oligonucleótidos Hyg-F y Targ2-R, tamaño teórico 2,916. Las reacciones de PCR se hicieron usando ADN genómico de las cepas $\Delta arg2$ - 1, 2, 3, 4 y 5. Como control negativo se utilizó ADN genómico de la cepa WT que no posee el gen *hph*. Para estimar los tamaños moleculares de los productos de PCR se usó el marcador de peso molecular 1 kb de Invitrogen.

7.2 Caracterización fenotípicas de mutantes auxótrofos $\Delta arg2$

7.2.1 Restauración de la prototrofia con L-arginina en cepas $\Delta arg2$

La prueba de restauración de auxotrofia mostro que las cepas $\Delta arg2$ -1, $\Delta arg2$ -2, $\Delta arg2$ -3, $\Delta arg2$ -4 y $\Delta arg2$ -5 son capaces de crecer en MM con las concentraciones de L-arginina de 0.5mM - 10mM y mostraron un crecimiento más rápido en los primeros días, pero una densidad de micelio menor que las cepas $\Delta arg2$ inoculadas en MM con 20mM o 50mM de L-arginina y que la cepa WT usada como control. Las concentraciones de 20mM y 50mM mostraron un crecimiento radial más parecido al crecimiento de la cepa WT en los primeros días de crecimiento (Figura 12)

En el quinto día las cepas $\Delta arg2$ inoculadas en MM con 50mM de L-arginina y las cepa WT alcanzaron el borde de la caja, mientras que cepas que se inocularon en MM con las menores concentraciones de L-arginina no alcanzaron en el mismo intervalo de tiempo el borde de la caja (Figura 12-A), indicando que 50 mM de L-arginina en MM es la cantidad necesaria para restaurar el crecimiento normal de las cepas $\Delta arg2$.

Debido a que las cepas $\Delta arg2$ restauraron su crecimiento comparable a la cepa WT con una concentración de 50mM, esta fue la concentración de L-arginina que fue seleccionada para analizar que las mutantes $\Delta arg2$ (Figura 12-B).

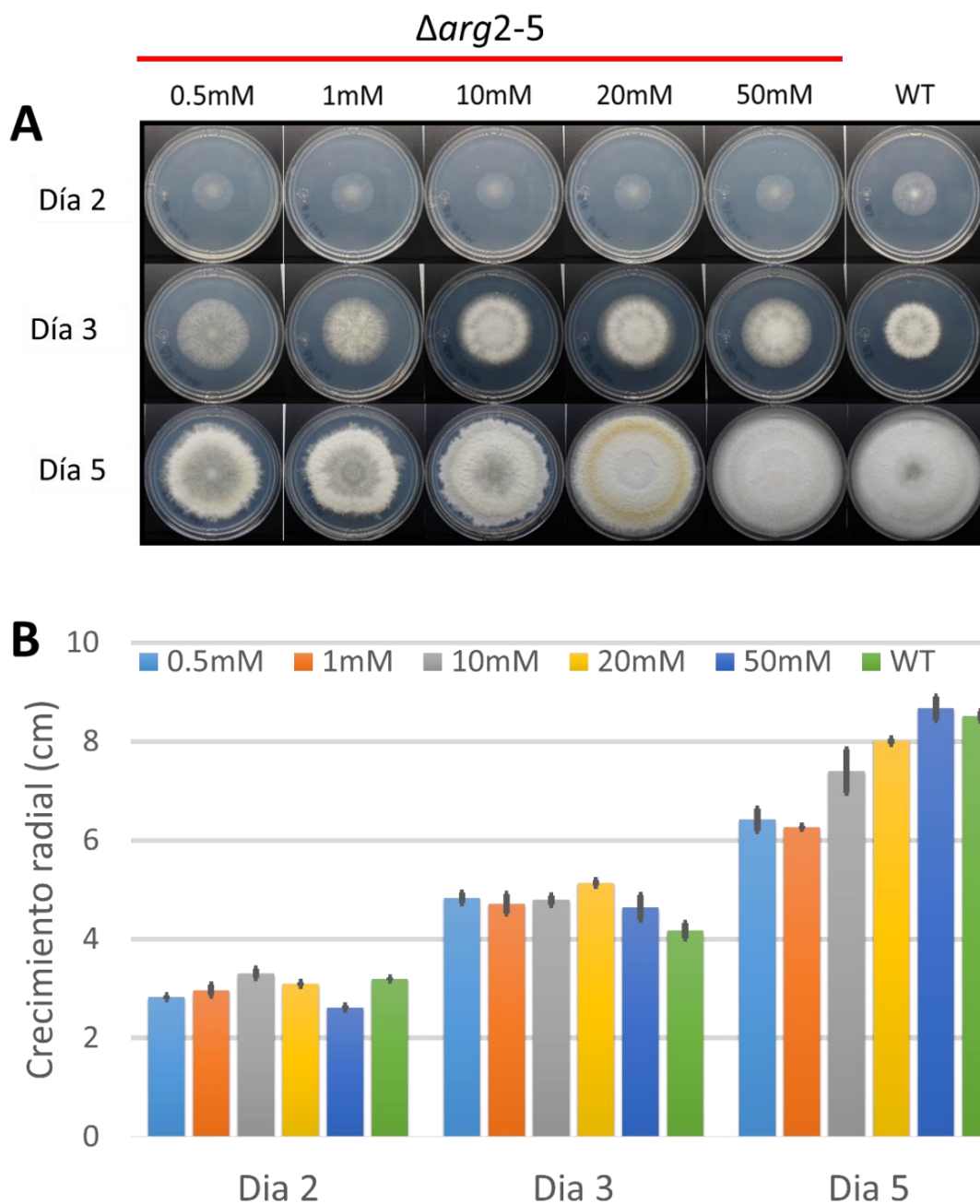


Figura 12. Determinación de la concentración mínima de L- arginina necesaria para restaurar la auxotrofia. (A) Prueba de restauración de crecimiento en las cepas auxótrofas. Las cepas se crecieron en MM con las concentraciones de L-arginina indicadas durante 5 días en presencia de luz a 27°C, se muestra la cepa representativa $\Delta arg2-5$. Como control se usó la cepa WT creciendo en MM sin L-arginina. **(B) La velocidad de crecimiento radial.** El crecimiento radial se determinó por triplicado para cada cepa, usando el programa *Image J*. Las barras representan los promedios de los valores de crecimiento radial \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.2.2 Producción de conidios en cepas $\Delta arg2$

Tanto en la cepas WT como las mutantes auxótrofas presentaron conidiación cuando se crecieron en presencia de luz constante y no presentaron producción de esporas en condiciones de oscuridad (Figura 13-A), lo que indica que el gen *arg2* puede ser implementado como un marcador de selección para realizar estudios de genómica funcional en las respuestas a la luz en *T. atroviride*.

Las cepas mutantes auxótrofas carentes del gen *arg2*, $\Delta arg2-1$ y $\Delta arg2-2$ después de 7 días de crecimiento en condiciones de iluminación constante no presentan una diferencia significativa comparada con la cepa WT en la producción de conidios creciendo en medio MM enriquecido con 50mM de L- arginina (Figura 13-B).

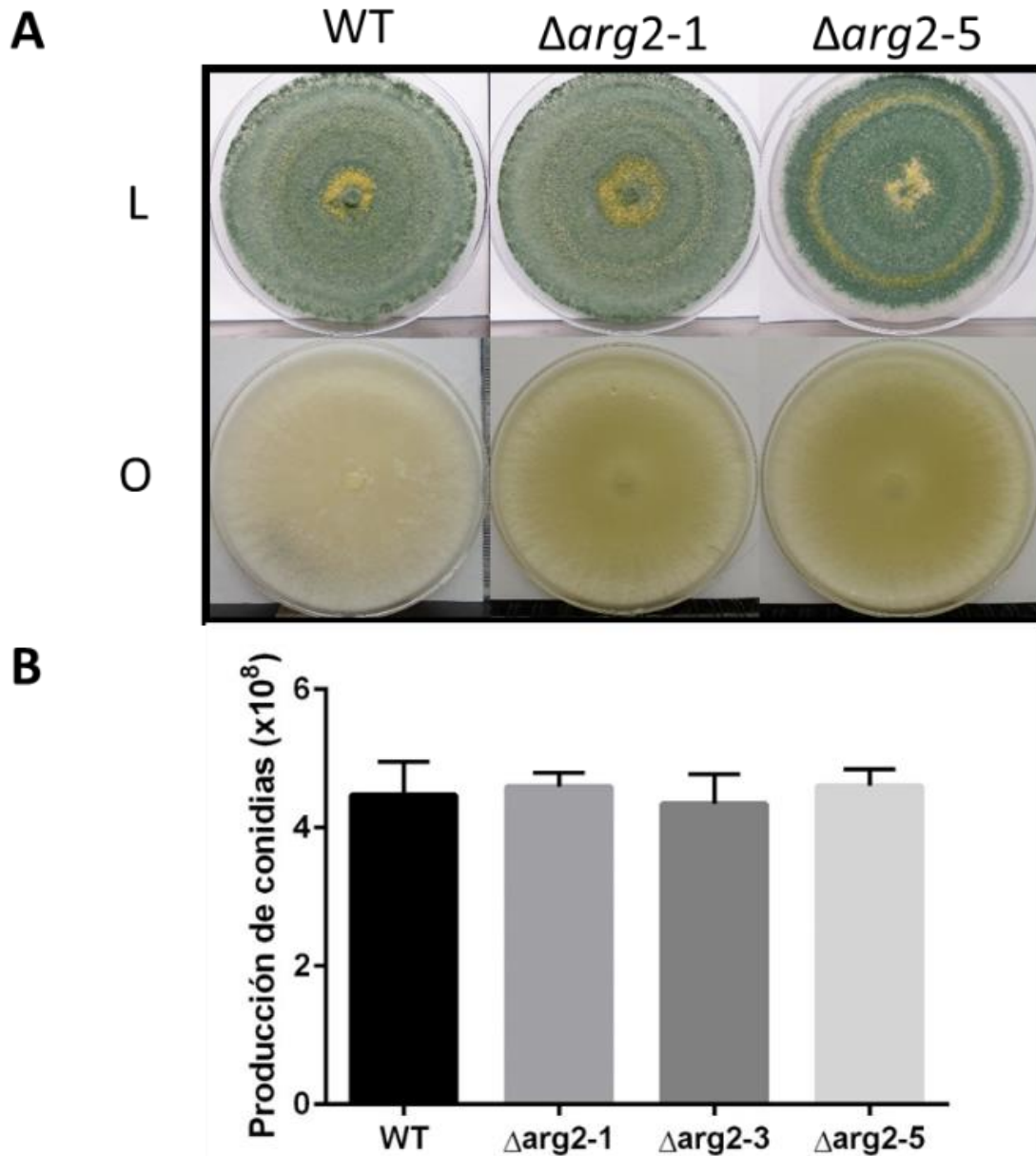


Figura 13. Producción de conidios inducidos por la luz en cepas WT y $\Delta arg2$. (A) Conidiación inducida por la luz. Las cepas WT y $\Delta arg2$ se crecieron en medio MM enriquecido con 50mM de L-arginina por triplicado durante 7 días en condiciones de luz constante (L) u oscuridad (O). (B) Producción de conidios. A los 7 días de inóculo, se colectaron las conidios de las cepas crecidas en luz (A) y se cuantificaron en microscopio utilizando una cámara de Neubauer. Se representan los promedios de los valores \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes y analizados con ANOVA ($\alpha=0.05$).

7.2.3 Conidiación inducida por daño mecánico en cepas $\Delta arg2$

Las cepas $\Delta arg2$ fueron inoculadas en medio MM complementado con 50mM de L- arginina, y como control la cepa WT inoculada en MM.

En la Figura 14-DM se muestra la respuesta al daño producido sobre el micelio de la cepa WT y las mutantes $\Delta arg2-1$ y $\Delta arg2-3$, en las que se observa la formación de conidióforos y consecuentemente la producción de conidios principalmente en las regiones donde se realizaron los cortes. Mientras que en los controles que crecieron en oscuridad no presenta la generación de conidios, al no someterse a una respuesta de estrés como el daño mecánico (Figura 14-C).

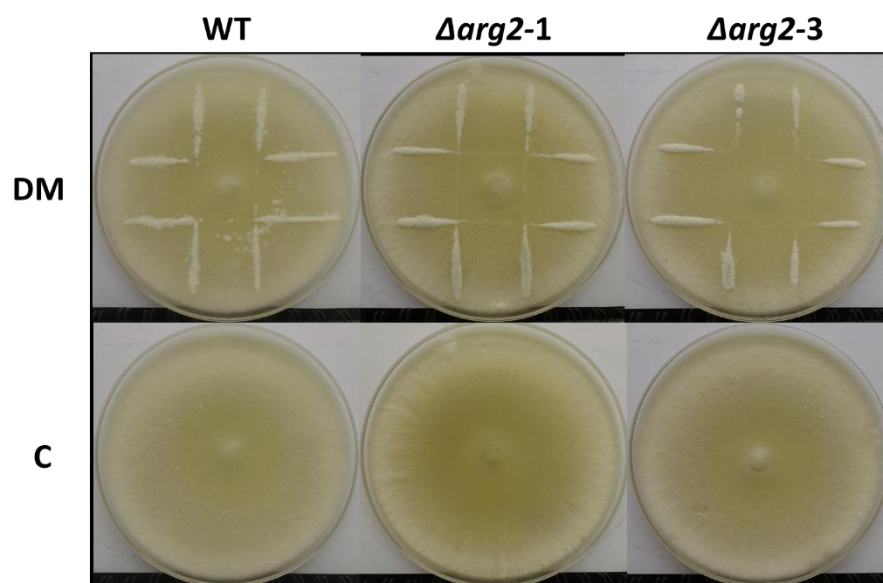


Figura 14. Producción de conidios inducidos por daño mecánico en las cepas WT y $\Delta arg2$. Medios de cultivo MM con 50mM arginina fueron inoculados con discos de micelio e incubados en oscuridad durante 36 horas. Posteriormente con un bisturí se realizaron cortes en el micelio en un cuarto oscuro con luz roja de seguridad y se incubaron por otro periodo de 48 horas. (**DM**) Daño mecánico. (**C**) Control.

7.3 Complementación de la auxotrofia

7.3.1 Complementación de la auxotrofia en una cepa $\Delta arg2$

Se observó que los amplicones generados de las diferentes versiones corresponden con el tamaño teórico esperado de cada versión corta del gen *arg2*, los productos de PCR se denominaron según su número de pb rio arriba y rio abajo del ORF del gen *arg2*, amplicón 200 (1869pb), 400 (2244pb), 600 (2558pb), 800 (3093pb), 1000 (3451pb) y 1200 (3896pb) (Figura 15).

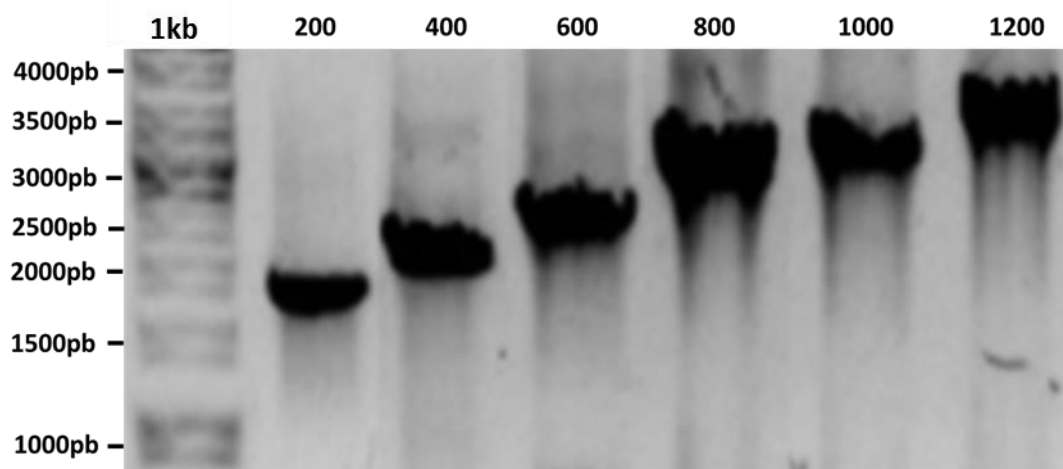


Figura 15. Amplicones de versiones cortas del gen *arg2*. Con parejas de oligonucleótidos (Tabla 2) se amplificaron diferentes versiones recortadas del gen *arg2*. Versiones de amplicones 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 representa el número de pb rio arriba y rio abajo del ORF y el tamaño teórico del amplicón: **200** (1869pb), **400** (2244pb), **600** (2558pb), **800** (3093pb), **1000** (3451pb) y **1200** (3896pb). Para estimar los tamaños moleculares de los productos de PCR se usó el marcador de peso molecular 1 kb de Thermo Scientific.

Realizada la transformación para la complementación de la auxotrofia a arginina (Figura 16-A), se observó que a partir de la versión de 600 pb rio arriba y abajo de la región codificante muestra un 23.7% de eficiencia para realizar la complementación del mutante (Figura 16-B). Es interesante señalar que la máxima eficiencia de complementación es logrado a partir de la construcción de 800 pb rio arriba y abajo de la región codificante de *arg2*.

Los resultados también indican que las construcciones generadas con las parejas de oligonucleótidos de 200pb y 400pb no lograron complementar la auxotrofia, lo que significa en esas versiones cortas ya no contienen todas sus secuencias regulatorias importantes para la transcripción del gen *arg2* o probablemente para que recombine en el genoma de la cepa mutante. En la figura 15-A C+, se demuestra la viabilidad de los protoplastos y se comprobó que el proceso de transformación no se vio afectado por la metodología. Además, también se realizó un control negativo (Figura 16-A C-), para validar que la complementación fue correcta y que es debido al casete de las versiones recortadas del gen *arg2* que se recuperó la capacidad de crecer en MM sin L- arginina (Figura 16).

Nuestros resultados indican que el tamaño mínimo viable para la complementación y para que las cepas puedan crecer en MM si L- arginina son 600 pb (*arg2*⁺-600) río arriba y río abajo del marco de lectura abierto del gen *arg2*, obteniendo un 23.7% de complementación, mientras que los fragmentos de 800 pb (*arg2*⁺-800), 1000pb (*arg2*⁺-1000) y 1200 pb (*arg2*⁺-1200) superan el 90% de complementación.

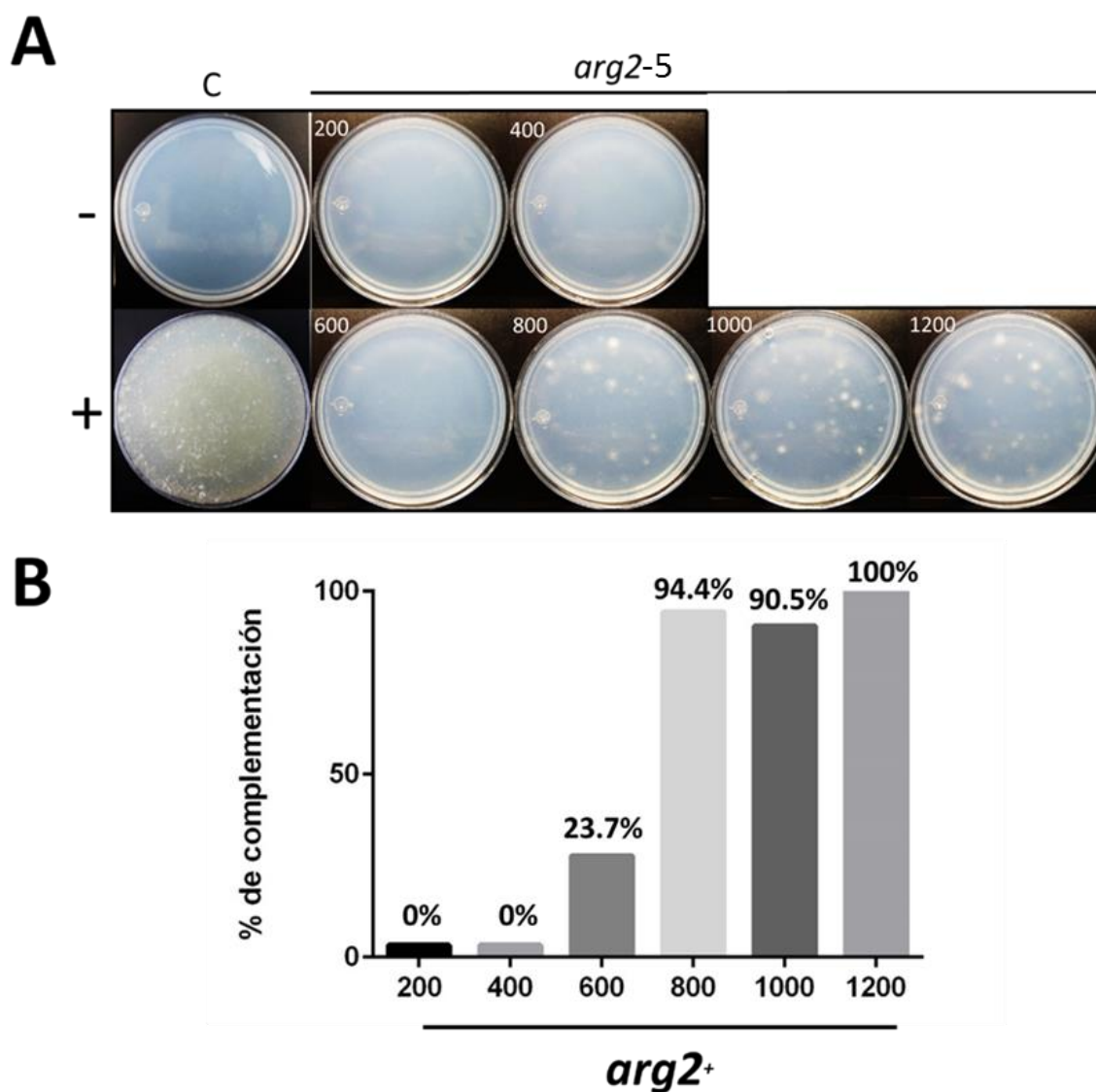


Figura 16. Complementación de auxotrofia. (A) Los protoplastos de la cepa $\Delta arg2-5$ fueron transformados con versiones recortadas del gen *arg2*. **C-**, Control negativo. **C+**, control de viabilidad. ***arg2-5***, los protoplastos de la cepa $\Delta arg2-5$ se transformaron con las diferentes versiones del gen *arg2*. (B) **Datos preliminares cuantitativos de complementación.** 100% de complementación el número de transformantes obtenidas con la versión **1200** del gen *arg2*. 0% de complementación en las versión de *arg2*⁺-200 y *arg2*⁺-400. El amplicón de *arg2*⁺-600 mostro un 23.7% de complementación, Las cepas con los fragmentos de *arg2*⁺-800, *arg2*⁺-1000, *arg2*⁺-1200 muestran el porcentaje superior al 90%.

7.3.2 Identificación molecular de complementación mediante PCR

Para la comprobación molecular de la complementación de las mutantes auxótrofas con el gen *arg2*, se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos que se unen en el gen *arg2* (Figura 17-A). Las cepas que hayan incorporado el gen *arg2* y remplazado por el marcador de selección *hph* mediante una doble recombinación homóloga presentaron amplificación con los oligonucleótidos, ORFarg2-F (Tabla 1) combinado con Targ2-R-200 (Tabla 2) con un tamaño teórico de 1,686 pb (Figura 17-B) y Parg2-F-200 (Tabla 2) con ORFarg2-R (Tabla 1) tamaño teórico 2,231 pb (Figura 17-C).

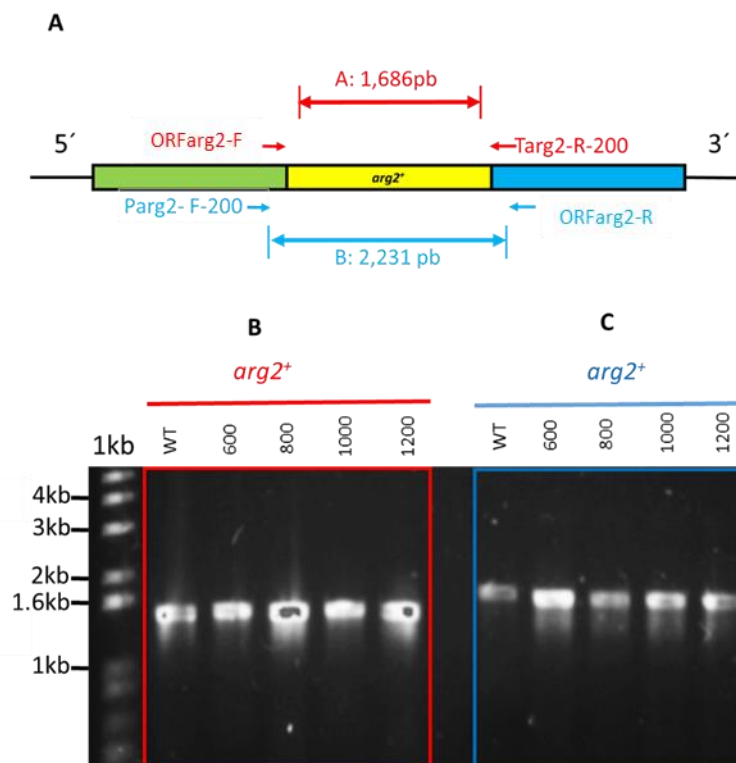


Figura 17. Identificación molecular de complementantes *arg2*⁺. (A) Diagrama de PCR para comprobación de complementación. (B) PCR para detectar la complementación usando los oligonucleótidos Parg2-F-200 y ORFarg2-R (1,686 pb). (C) PCR para detectar la complementación usando los oligonucleótidos ORFarg2-F y Targ2-R-200 (2,231 pb). Las reacciones de PCR se hicieron usando ADN genómico de las cepas indicadas en cada carril de los gels en A y en B. Para estimar los tamaños moleculares de los productos de PCR se usó el marcador de peso molecular 1 kb de Invitrogen.

7.3.3 Producción de conidios inducidos por la luz y daño en las cepas complementadas

La producción de conidios estimulada por la luz fue similar entre las cepas *arg2⁺* y la cepa WT, sin mostrar una aparente diferencia significativa en MM sin L-arginina (Figura 18-A).

Las cepas complementadas *arg2⁺* de cada una de las versiones del gen *arg2* fueron sometidas a prueba de daño mecánico y donde se observó una respuesta de las cepas *arg2⁺* similar a la WT en todas las versiones con los diferentes tamaños de las complementaciones, 600 pb, 800 pb, 1000 pb, 1200 pb (Figura 18- B- D). Las cepas *arg2⁺-600*, *arg2⁺-800*, *arg2⁺-1000* y *arg2⁺-1200* mostraron un anillo de esporulación al recibir un pulso de luz azul al igual que la silvestre (Figura 18- B- L), mientras que los controles al mantenerse creciendo en oscuridad no presentaron esporulación, solamente desarrollaron micelio tanto en las cepas *arg2⁺* y la cepa WT (Figura 18- B- C). Estos resultados indican que al regresarles el gen *arg2* a las cepas auxótrofas se recuperó el fenotipo silvestre demostrando la utilidad del gen *arg2* como un marcador seleccionable en *T. atroviride*.

Las pruebas indican que las cepas *arg2⁺-600*, *arg2⁺-800*, *arg2⁺-1000* y *arg2⁺-1200* se comportan como la cepa silvestre en condiciones de un medio mínimo sin L-arginina. Cada cepa complementada con las versiones recortadas del gen *arg2*, desde el amplicón más pequeño de 600pb hasta el amplicón de 1200pb, mostraron una respuesta comparable a la cepa WT.

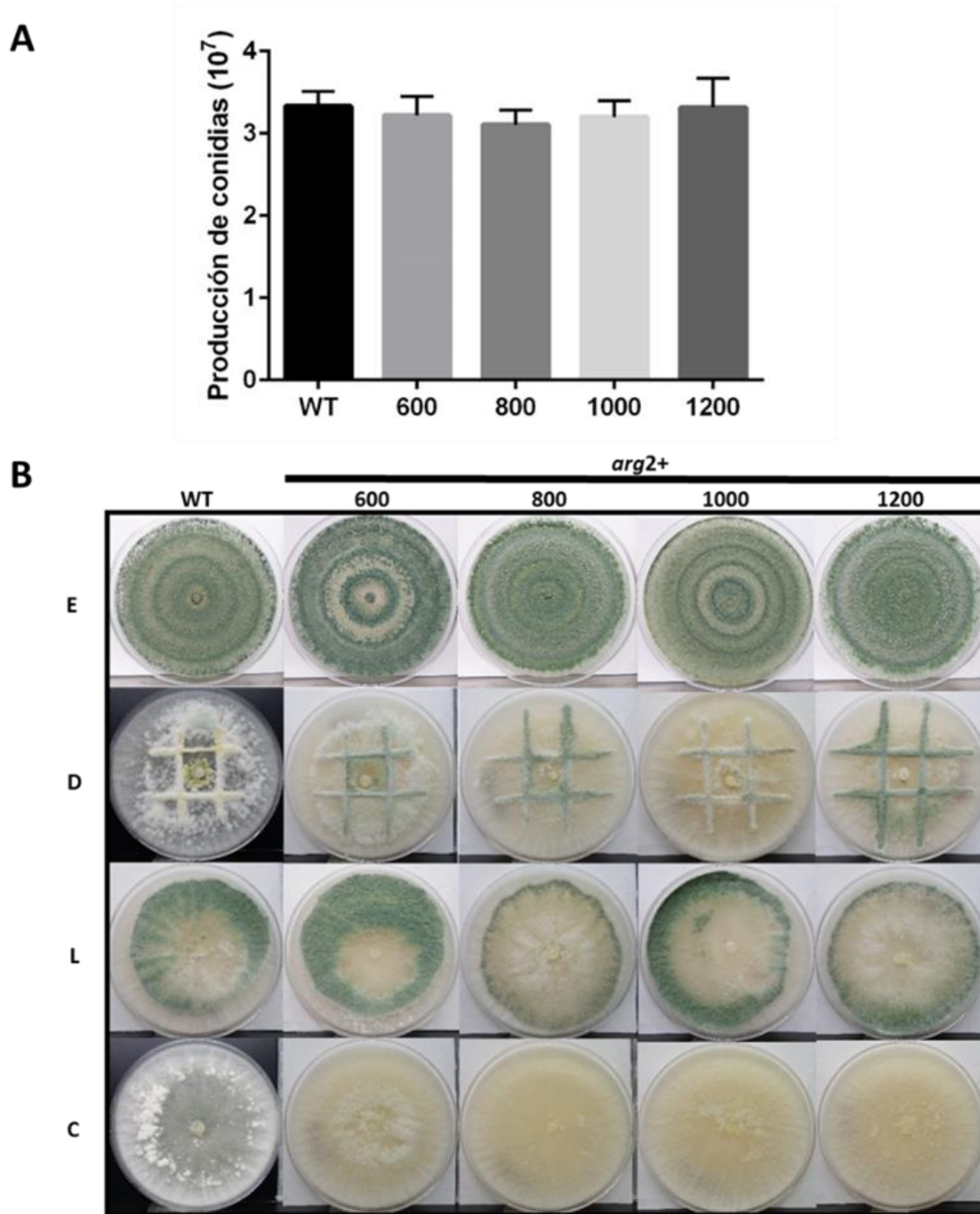


Figura 18. Producción de conidios inducidas por daño y luz en cepas complementantes (*arg2⁺*). (A) Producción de conidios. Las cepas complementadas *arg2⁺-600*, *arg2⁺-800*, *arg2⁺-1000*, *arg2⁺-1200* no presentaron diferencias significativas comparadas con la cepa WT. Se representan los promedios de los valores \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes, analizados con ANOVA ($\alpha=0.05$). (B) Conidiación inducida por daño y luz. Las cepas WT y *arg2⁺* se crecieron en MM (E) Conidiación producida por luz constante durante 7 días. (D) Conidiación por daño mecánico. (L) Generación de esporas como respuesta a un pulso de luz azul. (C) Control, cepas crecidas en oscuridad.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Obtención de mutantes auxótrofos a arginina

Los métodos para la generación de mutantes auxótrofos en hongos filamentosos han consistido en técnicas basadas en una mutagénesis saturante, que no es específica (Velazques-Robledo *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2011), lo que complica su utilidad en proyectos de genómica funcional. En este trabajo se abordó la posibilidad de desarrollar una estrategia novedosa que evita generar alteraciones inespecíficas en el genoma de la célula para la implementación del gen *arg2* como marcador de selección, con el objetivo de resolver las problemáticas y limitaciones ya mencionadas.

En una primera aproximación, las cepas auxótrofas se obtuvieron mediante la generación de protoplastos y la técnica de doble recombinación homóloga, en la que se utilizó el gen marcador *hph* para la obtención de la auxotrofia a arginina, esto fue necesario para poder reemplazar el gen *arg2* y seleccionar de una manera rápida y fácil las cepas $\Delta arg2$ con la finalidad de caracterizar la función del gen *arg2* y ajustar las condiciones experimentales óptimas para la obtención de mutantes auxótrofos a arginina como fue determinar la concentración mínima de arginina capaz de restaurar la auxotrofia.

La especificidad en la obtención de la mutante auxótrofa se logró mediante la construcción de casetes por PCR, que incluye un gen de selección *hph*, flanqueado por las regiones 5' y 3' del gen *arg2* necesarias para la doble recombinación homóloga. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la investigación debido a su alta especificidad para el estudio de genes concretos (Derntl *et al.*, 2015).

Hasta este punto no hay diferencia entre la obtención de mutantes específicas por la técnica de doble recombinación homóloga, en comparación con

trabajos previos Groot *et al.*, 1998; Baek y Kenerley, 1998; Schuster *et al.*, 2012; Magaña-Ortíz *et al.*, 2013). Ya que estos trabajos también comparten la especificidad de la técnica en la que un gen marcador de selección reemplaza el gen de interés.

8.2 Caracterización fenotípica de mutantes auxótrofos $\Delta arg2$

Para conocer que precisamente este reemplazo fue específico se llevó a cabo un escrutinio en el cual se probaron diferentes concentraciones de L- arginina en el medio, gracias a esta prueba se concluyó que la concentración necesaria para restaurar la auxotrofia es de 50mM de L- arginina en el MM y que por lo tanto las cepas $\Delta arg2$ que crecieron en esta concentración mostraron un fenotipo comparable a la cepa silvestre al analizar el crecimiento y la reproducción asexual inducida por luz y daño mecánico.

La importancia de conocer la concentración de L- arginina que restablece la auxotrofia es significativa debido a que la auxotrofia es una mutación condicional, en la que sin las circunstancias especiales de crecimiento no son las apropiadas se ve afectada la viabilidad de la cepa auxótrofa, como se pudo observar en las cepas $\Delta arg2$ que crecieron en concentraciones de 50mM de arginina.

Mediante las pruebas de crecimiento radial, la generación de conidios por respuesta a luz y respuesta a daño, se determinó que solamente se vio afectada la síntesis de arginina por la eliminación del gen *arg2* mediante el reemplazo por doble recombinación homóloga, sugiriendo que no se dañó ningún otro *locus* en el genoma de *T. atroviride*.

Los resultados obtenidos de estos experimentos de conidiación inducida por respuesta a luz y daño mecánico, en las cepas mutantes auxótrofas $\Delta arg2$ creciendo en un MM suplementado con 50mM de L- arginina no muestran una diferencia significativa en comparación de la cepa WT creciendo en las misma

condiciones de temperatura y luz en MM esto significa que el gen *arg2* puede ser implementado como un marcador de selección para estudios de genómica funcional en *T. atroviride*.

8.3 Complementación de la auxotrofia

Una vez comprobada la respuesta fenotípica de las cepas $\Delta arg2$, se procedió a la implementación del gen *arg2* como un marcador de selección, para lo cual amplicones de versiones cortas del gen *arg2* fueron utilizados (Figura 15). Datos preliminares de la prueba de complementación mediante los fragmentos de diferentes tamaños del gen *arg2* mostraron que el amplicón de 2.5Kb es el tamaño mínimo para su implementación como un marcador de selección, ya que este tamaño es capaz de complementar la auxotrofia a arginina (Figura 16). Sin embargo, para obtener una máxima eficiencia en la recombinación homóloga en *T. atroviride* es más recomendable usar al menos 800 pb flanqueando el marcador de selección.

Estos datos preliminares apoyan su implementación como un marcador de selección con las versiones cortas del gen *arg2*, siendo el tamaño mínimo viable para esta complementación la versión con 600pb flanqueantes del marco de lectura del gen *arg2*. Este fragmento obtuvo un menor porcentaje 23.7% de complementantes *arg2*⁺, comparado con las versiones de 800 pb, 1000 pb y 1200 pb, que mostraron un mayor porcentaje que rondaba el 90%- 100% de complementación.

Esta disminución en el porcentaje del número de complementantes obtenidas con el amplicón de 600pb puede deberse a la disminución de la capacidad de reconocimiento por parte de las enzimas involucradas en la recombinación homóloga (Shinohara y Shinohara, 2004), en comparación a los fragmentos de 800 pb, 1000 pb, y 1200 pb que al poseer regiones flanqueantes de mayor tamaño lo que puede facilitar que la maquinaria de recombinación homóloga incremente la

probabilidad de reconocimiento, obteniendo así un mayor porcentaje de colonias complementantes de casi un 100%.

Otra hipótesis puede ser que en la región promotora omitida, en los amplicones menores de 600 pb se encuentran las secuencias requeridas para la activación de la transcripción de la subunidad pequeña de la CFS-A, por parte los factores de transcripción y de la ARN polimerasa (Datto *et al.*, 1995; Rogers *et al.*, 2001).

Obtenidas las complementantes se comparó su respuesta de formación de conidios generados en respuesta a un pulso de luz y daño mecánico, así como el número de conidios total generados con la cepa WT, en búsqueda de características que difieran de la cepa WT, en cambios que disminuyan la adecuación, así como la pérdida en la respuesta adaptativas al estrés en las cepas complementantes. Los resultados indican que las diferentes pruebas que se realizaron en las cepas *arg2*⁺, no muestran una diferencia significativa en comparación de la cepa silvestre, incluso el amplicón de 600pb que mostro un menor porcentaje en el número de colonias complementadas en comparación de los amplicones más grandes de 800 pb, 1000 pb y 1200 pb, y mostro características de respuesta similares a la cepa WT.

Los datos obtenidos de generación de la mutantes auxótrofa a arginina comprueban que el remplazamiento génico por medio de la técnica de doble recombinación homóloga se da de una manera específica, y los datos preliminares obtenidos siguieren que el gen *arg2* puede ser utilizado como marcador de selección utilizando el amplicón de 800pb, ya que al ser este el de menor tamaño y con una mayor eficiencia de complementación, que consecuentemente traería como beneficios su aplicación para la búsqueda funcional de genes de interés, mediante la restauración de la auxotrofia, reduciendo costos el evitar el uso con antibiótico, inclusive los datos preliminares de las complementación con las versiones recortadas del gen, pueden mejorar la metodología reduciendo el tiempo necesario para la generación de las construcciones.

Las limitantes de este trabajo en comparación de otros genes aplicados como marcador de selección es que el gen *arg2* no es un marcador auxótrofo bidireccional, como lo es el gen *pyr4* (Gruber *et al.*, 1993) *hvk1* (Guangtao *et al.*, 2009) genes marcadores de selección que generan mutantes auxótrofos, que si crecen en un medio enriquecido con ácido 5 fluororotico la auxotrofia bidireccional solo permitirá a las mutantes que hayan remplazado el gen *pyr4* de manera específica crecer, y las cepas que no hayan remplazado el gen serán incapaces de crecer en el medio. El gen *arg2* no posee esta bidireccionalidad, pero igualmente la caracterización realizada puede emplearse para su aplicación como una poderosa herramienta para la obtención de mutantes específicas.

IX. CONCLUSIONES

- Las cepas auxótrofas a arginina al ser obtenidas mediante doble recombinación homóloga no sufren alteraciones en el fondo genético y la auxotrofia puede ser revertida en su totalidad con L-arginina.
- El gen *arg2* es esencial para la síntesis de arginina en *T. atroviride* sin afectar otras funciones en la reproducción asexual y crecimiento.
- El tamaño mínimo viable del gen *arg2* para la complementación de la auxotrofia a arginina es de 2.5 kb, que posibilita una reducción de tiempo y consumibles para las futuras metodologías.
- El gen *arg2* puede ser utilizado como un marcador de selección para la investigación de la función de otros genes de interés en *T. atroviride*.

X. PERSPECTIVAS

- Generar la auxotrofia a arginina por co-transformación con el plásmido pCB100 utilizando solamente las regiones 5' y 3' unidas, sin incluir el marcador de selección *hph* en el casete.
- Generar doble o triples mutantes con otras auxotrofías como *pyr4* y *bioB* en *T. atroviride* para el estudio de varios genes a la vez.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Aghcheh, R.K., I. S. Druzhinina, and C. P. Kubicek. 2013. The Putative Protein Methyltransferase LAE1 of *Trichoderma atroviride* is a Key Regulator of Asexual Development and Mycoparasitism. PLoS ONE, 8: 6 e67144.
- Ahmad, J. S., and C. P. Baker. 1988. Rhizosphere competence of benomyl-tolerant mutants of *Trichoderma* spp. Can J Microbiol. 34: 694-696.
- Antal, Z., L. Manczinger, and L. Ferenczy. 1997. Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. Biotechnol Tech. 11, No 3, pp. 205–208.
- Baek, J. M., and C. P. Kenerley. 1998. The *arg2* Gene of *Trichoderma virens*: Cloning and Development of a Homologous Transformation System. Fungal Genet Biol. 23, 34–44.
- Bal, J., E. M. Kajtaniak, and N. J. Pieniazek. 1977. 4-Nitroquinoline-1- oxide: A good mutagen for *Aspergillus nidulans*. Mutat Res. 56: 153–156.
- Bailey, A. M., G. L. Mena, and A. Herrera-Estrella. 1993. Transformation of four pathogenic *Phytophthora* spp by microprojectile bombardment on intact mycelia. Curr Genet. 23:42-46.
- Bartnicki-García, S. 1996. The Hypha: unifying thread of the fungal kingdom. A Century of Mycology. Sutton B. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. 105-133.
- Beadle, G. W., and E. L. Tatum. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. Genetics, 27: 499- 506.
- Bej, A. K., and M. H. Perlin. 1989. A high efficiently transformation system for the basidiomycete *Ustilago violacea* employing hygromycin resistance and lithium-acetate treatment. Gene. 80 171-176.
- Benitez, T., A. M. Rincon, M. C. Limon, and A. C. Codon. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int Microbiol. 7: 249-260.
- Bergés, T., and C. Barreau. 1991. Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. Curr. Genet, 19:359-365.

-
- Bissette, J. 1991. *Trichoderma atroviride*. Can J Bot. 70: 639-641.
- Carlile, M. J., S. C. Watkinson, and G. W. Gooday. 2001. The fungi. Ed. Academic Press. USA.
- Casas-Flores, S., M. Rios-Momberg, M. Bibbins, P. Ponce-Noyola, and A. Herrera-Estrella. 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. Microbiology, 150: 3561–3569.
- Case, M. E., M. Schweizer, S. R. Kushner, and N. H. Giles. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc Natl Acad Sci. 76, 5259-5263.
- Castellanos, F., M. Schmoll, P. Martínez, D. Tisch, C. P. Kubicek, A. Herrera-Estrella, and E. U. Esquivel-Naranjo. 2010. Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. Fungal Genet. Biol. 47: 468–476.
- Catcheside, D. G. 1954. Isolation of Nutritional Mutants of *Neurospora crassa* by Filtration Enrichment J. Gen. Microbiol. 11, 34-36.
- Datto, M. V., Y. Yu, and W. Xiao-Fan. 1995. Functional Analysis of the Transforming Growth Factor Responsive Elements in the WAF1/Cip1/p21 Promoter. J. Biol. Chem. 270 48: 28623–28628. doi: 10.1074/jbc.270.48.28623
- Davis, R. H. 1986. Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 50: 280–313.
- Davidson, R. C., J. R. Blankenship, P. R. Kraus, M. Berrios, C. M. Hull, C. D´Souza, P. Wang, and J. Heitman. 2002. A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. Microbiology, 148: 2607–2615.
- Dean, R., J. L. A. Van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosak, A. Di Prieto, P. D. Spano, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis, and G. D. Foster. 2012. The top ten fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol, Mar 6.
-

-
- Derntl, C., D. P. Kiesenhofer, A. R. Mach, and Mach- Ainger. 2015. Novel strategies for genomic manipulation of *Trichoderma reesei* with the purpose of strain engineering. *Am Soc Microbiology*. 10:1128-AEM.01545-15.
- Diolez, A., T. Langin, C. Gerlinger, Y. Brygoo and Marie-Josée Daboussi. 1993. The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. *Gene*. 131:1 pp 61–67.
- Dodd, S. L., E. Lieckfeldt and G. J. Samuels. 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*. 95:1 27-40
- Fries, N. 1947. Experiments with different methods of insolation physiological mutations of filamentous fungi. *Nature*, 4032: 199.
- Goldman, G. H., M. Van Montagu, and A. Herrera-Estrella. 1990. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr Genet* 17:169-1174.
- Gouka, R. J., W. Van Hartingsveldt, R. A. L. Bovenberg, C. M. J. Van Zeijl, C. A. M. J. J. Van Den Hondel, and R. F. M. Van Gorcom. 1993. Development of a new transformant selection system for *Penicillium chrysogenum*: isolation and characterization of the *P. chrysogenum* acetyl-coenzyme A synthetase gene (*OeacA*) and its use as a homologous selection marker. *Appl Microbiol Biotechnol*. 38:514-519.
- Grigoriev, I. V., H. Nordberg, I. Shabalov, A. Aerts, M. Cantor, D. Goodstein, Al. Kuo, S. Minovitsky, R. Nikitin, R. A. Ohm, R. Otilar, A. Poliakov, I. Ratnere, R. Riley, T. Smirnova, D. Rokhsar, and I. Dubchak. 2011. The genome portal of the department of energy joint genome institute. *Nucleic Acids Res*, 0: gkr947v1-gkr947.
- Groot, J. A., P. Bondock, P. J. J. HooKaas, and B. G. M. Beijersbergen. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 16; 839- 842.
- Gruber, E., J. Visser, C. P. Kubicek, and L. H. de Graaff. 1993. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. *Curr Genet*. 24:349-356.
-

-
- Guangtao, Z., B. Seiboth, C. Wen, Z. Yaohua, L. Xian, and T. Wang. 2009. A novel carbon source-dependent genetic transformation system for the versatile cell factory *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). FEMS Microbiol Lett 303; 26–32.
- Hermosa, R., A. Viterbo., I. Chet, and E. Monte. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158:17-25.
- Herrera-Estrella, A. and I. Chet. 1998. Biocontrol of bacterial y phytopathogenic fungi. Agricultural Biotechnology. En: “Colwell, R. R., First, N. L., Schell, J. and Vasil, I. K.” Marcel Dekker, Inc. pp. 263-282.
- Hjeljord, L. G., A. Stensvandb and A. Tronsmoa. 2000. Effect of Temperature and Nutrient Stress on the Capacity of Commercial *Trichoderma* Products to Control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in Greenhouse Strawberries. Biological Control. 19:2 pp149–160.
- Jensen, D. F., and H. Wolffhechel. 1995. Biological control: Benefits and Risks. The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp., to control root rot and damping-off diseases. pp. 177- 189. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kubicek, C. P., and G. Harman. 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Vol. 1. Ed. Taylor & Francis. pp. 18-29.
- Kubicek, C. P., A. Herrera-Estrella, V. Seidl-Seiboth, D. A. Martinez, I. S. Druzhinina, M. Thon, S. Zeilinger, S. Casas-Flores, B. A. Horwitz, P.K. Mukherjee, M. Mukherjee, L. Kredics, L. D. Alcaraz, A. Aerts, Z. Antal, L. Atanasova, M. G. Cervantes-Badillo, J. Challacombe, O. Chertkov, K. McCluskey, F. Culpier, N. Deshpande, H. von Doehren, D. J. Ebbola, E. U. Esquivel-Naranjo, and I. V. Grigoriev. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style *Trichoderma*. Genome Biol. 12(4):R40.
- Latgé, J. P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Mol Microbiol, 66: 279-290.
-

-
- Luo, Z. and M. S. Sachs. 1996. Role of an upstream open reading frame in mediating arginine-specific translational control in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 178: 8 2172-2177.
- Lv, J., L. Wang, Y. Wang, Y. Huang, X. Chen. 2015. Isolation and Molecular Identification of Auxotrophic Mutants to Develop a Genetic Manipulation System for the Haloarchaeon *Natrinema* sp. J7-2. Archea. Volume 2015, Article ID 483194, 16 pag. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/483194>.
- Magaña-Ortiza, D., N. Coconi-Linaresa, E. Ortiz-Vazquez, F. Fernández, A. M. Loskec and M. A. Gómez-Lima. 2013. A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. Fungal Genetics and Biology. 56 pp 9-16.
- Messenguy, F. 1976. Regulation of Arginine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation of a cis-Dominant, Constitutive Mutant for Ornithine Carbamoyltransferase Synthesis. J. Bacteriol. Vol. 128: 1 49-55
- Mukherjee, P. K., B. A. Horwitz, and C. M. Kenerley. 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* a genomic perspective. Microbiology, 158:35-45.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocadium*: Biology, Ecology, and potential for Biocontrol. *Ann Rev Phytopath.* 23: 23-54.
- Peberdy, J. F. 1989. Fungi without coats-protoplasts as tools for mycological research. Mycol Res. 93:1–20.
- Prabha, V. L. and N. S. Punekar. 2004. Genetic transformation in *Aspergilli*: Tools of the trade. Indian J of Biochem Bio. 41: 205-215.
- Radford, A., S. Pope, A. Sazci, M. J. Fraser, and J. H. Parish. 1981. Liposome-Mediated Genetic Transformation of *Neurospora crassa*. Mol Gen Genet. 184:567 569.
- Rogers, G. W., N. J. Richter, W. F. Lima and W. C. Merrick. 2001. Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. J Biol Chem. 17;276(33):30914-22.
- Rosen, D., M. Edelman, E. Galun, and D. Danon. 1974. Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma viride*: structural changes in mitochondrial and other spore
-

- constituents during conidium maturation and germination. *J. Gen. Microbiol.* 83: 31-49.
- Shinohara, A., and M. Shinohara. 2004. Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenet Genome Res* 107:201–207. DOI: 10.1159/000080598
- Shiotani, H. and T. Takashi. 1995. Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Mol Gen Genet.* 248: 142-150.
- Shoresh, M., G. E. Harman, and F. Mastouri. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol*, 48:21-43.
- Uresti-Rivera, E. E. 2008. Epigenética del sistema visual y del fenómeno de micoparasitismo en *Trichoderma atroviride*: Un análisis del gen ortólogo a GCN5. Tesis de maestría. San Luis Potosí, México.
- Tsuchiya, K., S. Tada, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai, Y. Jigami and G. Tamura. 1992. High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38:1, pp 109-114.
- Tudzynski, B., K. Mende, K. M. Weltring, J. R. Kinghorn, and S. E. Unkles. 1996. The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. *Microbiology.* 142, 533-539.
- Velázquez-Robledo, R., H. A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez, A. Hernández-Morales, J. Aguirre, S. Casas-Flores, J. López-Bucio and A. Herrera-Estrella. 2011. Role of the 4-Phosphopantetheinyl Transferase of *Trichoderma virens* in Secondary Metabolism and Induction of Plant Defense Responses. *MPMI Vol. 24, No. 12, 2011*, pp. 1459–1471. DOI: 10.1094 /MPMI -02-11-0045.
- Wiest, A., D. Grzegorski, B. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D. J. Ebbole, B. Bodo, and C. Kenerley. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem.* 277: 20862- 20868.
- Woodward, V. W., J. R. De Zeeuw, and A. M. Srb. 1954. The separation and isolation of particular biochemical mutants of *Neurospora* by differential germination

- of conidia, followed by filtration and selective plating. *Genetics*. 40: 192-200.
- Yu, J., Z. Hamari, K. H. Han, J. A. Seo, Y. Reyes-Domínguez, and C. Scazzocchio. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, 41: 973–981.
- Zeilinger, S. 2004. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr Genet*, 45: 54–60. DOI 10.1007/s00294-003-0454-8.
- Zhong, Y. H., X. L. Wang, T. H. Wang, and Q. Jiang. 2007. *Agrobacterium* mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1348–1354.
- Zhong, Y. H., H. Yu, X. Wang, Y. Lu, and T. Wang. 2011. Towards a novel efficient T-DNA-based mutagenesis and screening system using green fluorescent protein as a vital reporter in the industrially important fungus *Trichoderma reesei*. *Mol Biol Rep*. 38:4145–4151 DOI 10.1007/s11033-010-0534-z.
- Zhu-Mei, H., M. S. Price, G. R. O'Brian, D. R. Georgianna and G. A. Payne. 2007. Improved protocols for functional analysis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. *BMC Microbiol*. 7:104 10.1186/1471-2180-7-104.